

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FENILALANINA  
DESIDROGENASE EM FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT  
DE ÁCIDO ESTEÁRICO E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DO  
AMINOÁCIDO FENILALANINA**

**Rafael Leonardo Cruz Gomes da Silva**

*Aluno*

**Luciano Caseli**

*Orientador*

**DIADEMA – 2020**

RAFAEL LEONARDO CRUZ GOMES DA SILVA

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FENILALANINA  
DESIDROGENASE EM FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT  
DE ÁCIDO ESTEÁRICO E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DO  
AMINOÁCIDO L-FENILANALINA

Dissertação apresentada, como exigência  
parcial para obtenção do título de Mestre em  
Química, ao Programa de  
Pós-Graduação Stricto Sensu do Instituto de  
Ciências Ambientais, Químicas e  
Farmacêuticas da Universidade Federal de  
São Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Caseli

DIADEMA

2020

**Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)**

Silva, Rafael Leonardo Cruz Gomes Da  
ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FENILALANINA  
DESIDROGENASE EM FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-  
BLODGETT DE ÁCIDO ESTEÁRICO E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO  
NA DETECÇÃO DO AMINOÁCIDO L-FENILALANINA / Rafael  
Leonardo Cruz Gomes Da Silva. -- Diadema, 2020.  
87 f.

Dissertação (Mestrado em Química - Ciência E Tecnologia Da  
Sustentabilidade) - Universidade Federal de São Paulo - Campus  
Diadema, 2020.

Orientador: LUCIANO CASELI

1. Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. 2. Fenilalanina  
desidrogenase. 3. Fenilcetonúria. 4. L-fenilalanina. 5. Biosensores. I.  
Título.

**ATA DA REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO / DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Câmara de Pós-Graduação e Pesquisa**

Aos quinze dias do mês de julho do ano de 2020, reuniu-se on line através da plataforma Google Meet (devido a suspensão das atividades em decorrência da pandemia do COVID-19) às 09:00 horas, a Comissão Julgadora para a DEFESA DE TESE DE MESTRADO, solicitada por **Rafael Leonardo Cruz Gomes da Silva**, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Química - Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade, que apresentou tese sob o Título: **ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA FENILALANINA DESIDROGENASE EM FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT DE ÁCIDO ESTEÁRICO E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DO AMINOÁCIDO L-FENILALANINA**.

A referida Comissão esteve constituída pelos Professores Doutores:

Prof(a). Dr(a). Diogo Silva Pelloso - Departamento de Química - da Universidade Federal de São Paulo;

Prof(a). Dr(a). Lucinéia Ferreira Ceridório - Departamento de Química - da Universidade Federal de São Paulo;

Prof(a). Dr(a). Celize Maia Tcacenco - Instituto Mauá de Tecnologia;

Prof(a). Dr(a). Luciano Caseli (orientador) - Departamento de Química - da Universidade Federal de São Paulo;

O(a) Presidente Prof(a). Dr(a). **Luciano Caseli**, inicia a sessão dando a palavra ao(a) candidato(a), que dispõe de um período de tempo entre trinta e cinquenta minutos, para expor sua tese. A seguir dá a palavra aos Professores para a arguição. Cada examinador(a) dispõe de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o(a) candidato(a) para as respostas. Tendo o(a) candidato(a) respondido todas as arguições em tempo hábil os membros da Banca Examinadora, emitiram seus Pareceres:

Prof. Drs. :

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera o(a) Sr(a) **Rafael Leonardo Cruz Gomes da Silva** habilitado(a) a receber o título de MESTRE EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. E por estarem de acordo, assinam a presente ata.

São Paulo, 15 de julho de 2020.

Prof(a). Dr(a) Diogo Silva Pelloso	(X) APROVADO ( ) REPROVADO
Prof(a). Dr(a) Lucinéia Ferreira Ceridório	(X) APROVADO ( ) REPROVADO
Prof(a). Dr(a) Celize Maia Tcacenco	(X) APROVADO ( ) REPROVADO
Prof(a). Dr(a) Luciano Caseli (orientador)	(X) APROVADO ( ) REPROVADO

Sugestões e Observações:



Documento assinado eletronicamente por Celize Maia Tcacenco, Usuário Externo, em 15/07/2020, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por Luciano Caseli, Docente, em 15/07/2020, às 15:18, conforme horário oficial de

15/07/2020

SEI/Unifesp - 0371655 - ATA DE DEFESA DISSERTAÇÃO E TESE



Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Lucineia Ferreira Ceridório, Docente, em 15/07/2020, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Diogo Silva Pellosi, Docente, em 15/07/2020, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida [clikando aqui](#), ou pelo endereço:

"[https://sei.unifesp.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifesp.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)" informando o código verificador 0371655 e o código CRC 8F0FEFB3.

Referência: Processo nº 23089.111133/2020-35

SEI nº 0371655

Dedico este trabalho a todos os profissionais da educação e a todos os pesquisadores que lutam por um Brasil melhor, pois é somente no conhecimento que existe a chance de libertação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço meus familiares e amigos de longa data por todo apoio, atenção e carinho até este ponto de minha jornada, especialmente à minha namorada Carolina Seki, por sempre estar ao meu lado e me apoiar nos momentos mais difíceis, muito obrigado meu amor.

Meus agradecimentos especiais ao meu amigo e tutor, Prof<sup>o</sup> Dr. Luciano Caseli, por todo ensinamento e empenho dedicados à minha formação acadêmica desde o início e até esse ponto.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Roger LeBlanc, por abrir as portas de seu laboratório em Miami e colaborar de forma ativa na execução deste trabalho.

Aos docentes da Universidade Federal de São Paulo campus Diadema, e em especial aos professores e amigos do Laboratório de Materiais Híbridos, por todos os bons momentos de vivência no laboratório e das boas risadas nos congressos científicos.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a este projeto (Processos número - 2018/00291-9 e 2019/01797-6) e de milhares de outros jovens pesquisadores, que assim como eu, acreditam no futuro da pesquisa e do ensino no Brasil. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino”.

(Paulo Freire)



## RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo da atividade superficial da enzima fenilalanina desidrogenase (PDH), pura e na presença do surfactante ácido esteárico (HSt), como filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). Para isso, empregamos técnicas de análise físico-química que permitiram avaliar a formação, morfologia, estruturação molecular, e estabilidade termodinâmica dos filmes produzidos. Estudos iniciais da atividade de superfície da PDH em água indicaram a presença de processos de adsorção/dessorção dinâmicos característicos de monocamadas interfaciais de materiais solúveis (monocamadas de Gibbs). O aumento da força iônica na subfase aquosa possibilitou a adsorção da enzima na interface, produzindo monocamadas de Langmuir estáveis. Os filmes formados na interface líquida foram transferidos para suportes sólido usando a técnica de LB com razões de transferência próximas à unidade em pressões de superfície de 30 mN/m. Espectroscopias na região do Infravermelho e por dicroísmo circular (DC) indicaram a presença majoritária de estruturas em  $\alpha$ -hélice paralelamente orientadas ao plano da superfície do suporte sólido. O filme de PDH apresentou alta rugosidade relativa e espessura média de 8 nm, conforme revelado por microscopia de força atômica (AFM). A enzima se inseriu regularmente em monocamadas do surfactante HSt, produzindo filmes de Langmuir mistos, interagindo com sinergia positiva, elevada pressão de exclusão de 25,3 mN/m e estabilidade termodinâmica suficiente para permitir a posterior transferência a suportes sólidos. Os filmes mistos PDH-HSt foram transferidos com sucesso para suportes sólidos de quartzo com taxas de transferência próximas à unidade, formando filmes LB com arquitetura do tipo Y com um máximo de 15 camadas. O crescimento do filme foi acompanhado através de técnicas espectroscópicas (fluorescência e DC) e de microscopia (AFM), apresentando sinais de intensidade diretamente de fluorescência proporcionais ao número de monocamadas transferidas. Observou-se também que interações hidrofóbicas entre a enzima e os grupos apolares do ácido carboxílico produziram alterações conformacionais na estrutura secundária da PDH, evidenciado pelo surgimento de bandas espectrais (infravermelho e DC) do tipo  $\beta$ -folha. A capacidade do filme em detectar o aminoácido L-fenilalanina a uma concentração fixa de 2,5 mM foi testada em tampão glicina (pH 10,4) por meio da técnica de espectroscopia no UV-vis, apresentando uma atividade de  $7,2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  para o filme LB com 15 camadas. Assim, foi possível verificar, como prova de conceito, que a produção de filmes de Langmuir estáveis da enzima PDH na presença de ácido esteárico podem ser utilizados na construção de filmes Langmuir-Blodgett capazes de detectar o aminoácido L-fenilalanina.

**Palavras-chave:** Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Fenilalanina desidrogenase. Fenilcetonúria. L-fenilalanina. Biosensores.

## ABSTRACT

The present work describes the study of the surface activity of the enzyme phenylalanine dehydrogenase (PDH), pure and in the presence of the stearic acid surfactant (HSt), such as Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) films. For this, we employed physical-chemical techniques that allowed evaluating the formation, morphology, molecular structure, and thermodynamic stability of the films produced. Initial studies of the surface activity of PDH in water indicated the presence of dynamic adsorption/desorption processes, characteristic of interfacial monolayers of soluble materials (Gibbs monolayers). The increase of the ionic strength in the aqueous subphase enabled the adsorption of the enzyme at the interface, Langmuir monolayers sufficiently stable to be transferred to solid supports. The films formed at the liquid interface were transferred to solid supports using the LB technique, with transfer ratios close to the unit at surface pressures as high as 30 mN/m. Infrared and circular dichroism (DC) spectroscopies indicated the majority of  $\alpha$ -helix structures parallel to the plane of the solid support surface. The PDH film showed high relative roughness and an average thickness of 8 nm, as revealed by atomic force microscopy (AFM) measurements. The enzyme was inserted regularly in monolayers of the fatty acid HSt, producing mixed Langmuir films, interacting with positive synergy, high exclusion pressure of 25.3 mN/m and thermodynamic stability. Mixed PDH-HSt films were successfully transferred to solid quartz supports with transfer ratios close to the unit forming Y-type LB films, with structures up to 15 layers. The growth of the film was followed by spectroscopic (fluorescence and DC) and microscopy techniques (AFM), showing intensity signals of fluorescence directly proportional to the number of transferred monolayers. It was also observed that hydrophobic interactions between the enzyme and the nonpolar groups of the carboxylic acid produced conformational changes in the secondary structure of the PDH, evidenced by the appearance of  $\beta$ -sheet spectral bands (infrared and DC). The mixed film's ability to detect the amino acid L-phenylalanine at a fixed concentration of 2.5 mM was tested in glycine buffer (pH 10.4) using the UV-vis spectroscopy technique, with an activity of  $7.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  for the 15-layered structure. Thus, it was possible to verify, as a proof of concept, that the production of stable Langmuir films of the PDH enzyme in the presence of stearic acid can be employed in the construction of LB films capable of detecting the amino acid L-phenylalanine.

**Keywords:** Langmuir and Langmuir-Blodgett films. Phenylalanine Dehydrogenase. Phenylketonuria. L-phenylalanine. Biosensors.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema do perfil de densidade em função da altura em um sistema contendo uma interface do tipo gás/líquido. ....	1
<b>Figura 2</b> - Esquema das principais interações ocorrendo entre moléculas no interior e na superfície de uma fase líquida. ....	2
<b>Figura 3</b> – Perfil de concentração de um soluto anfifílico em função da altura na região de interface entre duas fases fluidas (interface do tipo gás/líquido). ....	3
<b>Figura 4</b> – Esquema da estrutura de uma molécula de material anfifílico. ....	4
<b>Figura 5</b> – Perfil da tensão de superfície em função da concentração de um soluto anfifílico (A) e em função de seu logaritmo natural (B). ....	5
<b>Figura 6</b> – Modelo de cuba utilizada na construção e estudo de filmes de Langmuir. ....	7
<b>Figura 7</b> – Exemplo do perfil de compressão isotérmica observado para o fosfolípido DPPC. ....	8
<b>Figura 8</b> - Esquema do funcionamento de um espectrofotômetro operando no modo PM-IRRAS. ....	12
<b>Figura 9</b> – Exemplo do processo de transferência de um material anfifílico para a superfície de um suporte sólido e as diferentes arquiteturas possíveis para os filmes de Langmuir-Blodgett. ....	13
<b>Figura 10</b> – Conversão do aminoácido L-fenilalanina à tirosina pela ação da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (A) e sua conversão à ácido fenilpirúvico pela ação da fenilalanina desidrogenase (B). ....	18
<b>Figura 11</b> – Isotermas pressão de superfície-área para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio com diferentes concentrações. ....	23
<b>Figura 12</b> – Cinética de adsorção da enzima PDH em subfase de NaCl 100 mM. O gráfico em anexo apresenta o acompanhamento da adsorção via espectroscopia no infravermelho para a região de 1500 a 1700 $\text{cm}^{-1}$ . ....	24
<b>Figura 13</b> - Isoterma potencial de superfície-área (curva em azul) e pressão de superfície-área (curva em preto) para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio 100 mM. ....	26
<b>Figura 14</b> – Ciclos de compressão e descompressão para o filme de PDH em subfase de NaCl 100 mM em pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C). ....	27
<b>Figura 15</b> – Ciclos de oscilação para a monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM para a pressão de superfície de 10 mN/m. ....	27
<b>Figura 16</b> – Perfis de estabilidade da monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM para pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C). ....	29
<b>Figura 17</b> – Espectros de PM-IRRAS para a monocamada de PDH adsorvida em subfase de NaCl 100 mM em diferentes pressões de superfície. ....	30
<b>Figura 18</b> – Espectro de absorção por UV-vis da monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM (A) e a correlação entre o sinal de absorbância e a pressão de superfície do filme (B). ....	31
<b>Figura 19</b> - Espectro de emissão por fluorescência da monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM (A) e a correlação entre o sinal de absorbância e a pressão de superfície do filme (B). ....	32
<b>Figura 20</b> – Microscopias no ângulo de Brewster para a monocamada de PDH em NaCl 100 mM antes da transição de fase para seu estado líquido-expandido (A), no início e ao longo da transição (B e C, respectivamente) e após a transição (D). Resolução de 3600 x 4000 $\mu\text{m}$ . ....	32
<b>Figura 21</b> - Espectros de emissão por fluorescência da enzima PDH em solução (curva em preto) e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo (curva em azul). ....	34

<b>Figura 22</b> - Espectros de dicroísmo circular da enzima PDH em solução (curvas em preto e vermelho) e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo (curva em azul). .....	35
<b>Figura 23</b> – Microscopia de força atômica de uma camada de PDH depositada sobre mica (A). Perfis de relevo destacados em azul (B) e vermelho (C). .....	36
<b>Figura 24</b> – Gráfico de variação de pressão de superfície em função da pressão de superfície inicial para a inserção da enzima PDH em monocamadas de HSt em subfase de NaCl 100 mM. ....	38
<b>Figura 25</b> – Isotermas pressão de superfície-área para o sistema HSt+PDH em diferentes concentrações de enzima. O gráfico em anexo representa os valores calculados para o fator de compressibilidade nas diferentes concentrações. ....	39
<b>Figura 26</b> - Potencial de superfície obtido ao longo da compressão isotérmica do filme híbrido HSt+PDH 300 µg/mL (curva em preto).....	40
<b>Figura 27</b> - Ciclos de compressão e descompressão para o filme misto de HSt+PDH 300 µg /mL em subfase de NaCl 100 mM em pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C).....	41
<b>Figura 28</b> - Perfis de estabilidade da monocamada mista de HSt+PDH 300µg/mL em subfase de NaCl 100 mM para pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C).....	42
<b>Figura 29</b> – Microscopia no ângulo de Brewster para a monocamada mista de HSt+PDH 300 µg/mL na pressão de 30 mN/m. Resolução de 3600 x 4000 µm. ....	43
<b>Figura 30</b> - Espectros de PM-IRRAS na região de 2800 a 3000 cm <sup>-1</sup> para a monocamada de HSt+PDH 300 µg/mL em subfase de NaCl 100 mM na pressão de superfície de 30 mN/m. ....	44
<b>Figura 31</b> - Espectros de PM-IRRAS na região de 1660 a 1760 cm <sup>-1</sup> para a monocamada de HSt+PDH 300 µg/mL em subfase de NaCl 100 mM na pressão de superfície de 30 mN/m. ....	45
<b>Figura 32</b> - Espectros de PM-IRRAS na região de 1500 a 1700 cm <sup>-1</sup> para a monocamada de HSt+PDH 300 µg/mL em subfase de NaCl 100 mM na pressão de superfície de 30 mN/m. ....	46
<b>Figura 33</b> – Espectros de emissão por fluorescência dos filmes LB de HSt+PDH com diferentes números de camadas depositadas (A) e a correlação existente entre o sinal de emissão e o número de camadas (B). ....	48
<b>Figura 34</b> – Comparação entre espectros de dicroísmo circular dos filmes LB de PDH (curva em preto) e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo (curva em azul). ....	49
<b>Figura 35</b> - Microscopia de força atômica de uma camada de HSt depositada sobre mica (A) e seu perfil de relevo destacado em azul (B). Microscopia de força atômica de uma camada do filme híbrido de HSt e PDH depositada sobre mica (C) e seu perfil de relevo destacado em azul (D). ....	50
<b>Figura 36</b> - Microscopia de força atômica de cinco camadas de HSt depositadas sobre mica (A) e seu perfil de relevo destacado em azul (B). Microscopia de força atômica de cinco camadas do filme híbrido de HSt e PDH depositadas sobre mica (C) e seu perfil de relevo destacado em azul (D). ....	51
<b>Figura 37</b> – Variação da absorvância em 340 nm versus tempo de reação para a concentração total de 2,5 mM de L-fenilalanina.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Correlação entre o módulo de compressibilidade ( $C_s^{-1}$ ) e a fase bidimensional apresentada por uma monocamada. Dados retirados de (DAVIES; RIDEAL, 1961).....	10
<b>Tabela 2</b> – Resumo das principais propriedades físico-químicas da enzima fenilalanina desidrogenase obtida de diferentes microorganismos. Dados retirados de (ASANO, 2010).....	17
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros reológicos calculados para a monocamada de PDH em diferentes pressões de superfície. ....	28
<b>Tabela 4</b> - Atribuição de bandas observadas na região de 1500 a 1600 $\text{cm}^{-1}$ do infravermelho.....	29
<b>Tabela 5</b> – Valores calculados para a deposição de uma única camada do filme LB da enzima PDH em suportes sólidos de quartzo.....	33
<b>Tabela 6</b> – Dados de deposição dos filmes LB via técnica de nanogravimetria por balança de quartzo. ..	47
<b>Tabela 7</b> – Valores de atividade enzimática da PDH ao longo de 60 minutos experimentais em diferentes condições.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica ( <i>atomic force microscopy</i> )
BAM	Microscopia no ângulo de Brewster ( <i>Brewster angle microscopy</i> )
CD	Dicroísmo circular ( <i>circular dichroism</i> )
CMC	Concentração micelar crítica ( <i>critic micelar concentration</i> )
HSt	Ácido esteárico
LB	Langmuir-Blodgett
LED	Diodo emissor de luz ( <i>light emitting diode</i> )
L-phe	L-fenilalanina ( <i>L-phenylalanine</i> )
QCM	Microbalança de quartzo ( <i>crystal quartz microbalance</i> )
PDH	Fenilalanina desidrogenase ( <i>phenylalanine dehydrogenase</i> )
PM-IRRAS	Espectroscopia de absorção-reflexão com modulação da luz polarizada ( <i>polarization modulation-infrared reflection-absorption spectroscopy</i> )
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
SPR	Ressonância dos plásmons de superfície ( <i>surface plasmon resonance</i> )
SRTN	Serviço de Referência em Triagem Neonatal

## LISTA DE SÍMBOLOS

$A$	área total de superfície
$A_m$	área média por molécula da substância
$C_i$	concentração da substância $i$
$F$	força
$G$	energia livre de Gibbs
$R$	constante universal dos gases
$T$	temperatura
$t$	tempo
$\Delta V$	diferença de potencial
$\Gamma_i$	quantidade adsorvida de $i$ por unidade de superfície
$\gamma$	tensão de superfície
$\gamma_0$	tensão de superfície da água
$\varepsilon$	permissividade
$\varepsilon_0$	permissividade do vácuo
$\theta$	ângulo de contato
$\mu$	momento de dipolo
$\pi$	pressão de superfície
$\varphi$	ângulo de fase
$l$	perímetro
$w$	Largura
$d$	espessura
$C_S^{-1}$	fator de compressibilidade
$E^*$	módulo complexo viscoelástico
$E'$	componente elástica
$E''$	componente viscosa
$p$	feixe eletromagnético paralelamente polarizado ao plano normal da interface
$s$	feixe eletromagnético perpendicularmente polarizado ao plano normal da interface
$R_p$	refletividade do feixe p-polarizado
$R_s$	refletividade do feixe s-polarizado
$\eta$	viscosidade dilatacional
$f$	frequência de oscilação

# SUMÁRIO

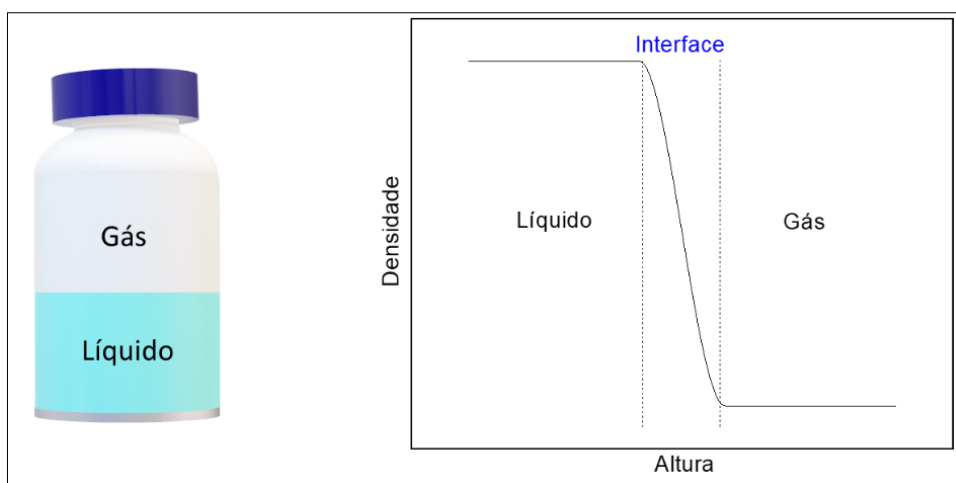
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Interfaces.....	1
1.1.1 Adsorção em interfaces fluidas.....	2
1.1.2 Filmes monomoleculares em interfaces fluidas .....	4
1.1.3 Formação de filmes de Langmuir .....	6
1.2 Principais técnicas de caracterização .....	8
1.2.1 Isotermas pressão de superfície-área.....	8
1.2.2 Isotermas potencial de superfície-área .....	9
1.2.3 Análises reológicas .....	9
1.2.4 Técnicas espectroscópicas.....	10
1.2.5 Técnicas microscópicas.....	12
1.3 Imobilização de monocamadas insolúveis em suportes sólidos .....	13
1.4 Principais aplicações para filmes de Langmuir .....	14
1.5 Principais aplicações para filmes de Langmuir-Blodgett.....	14
1.6 Fenilcetonúria e detecção da L-fenilalanina.....	15
1.7 Fenilalanina desidrogenase (PDH) .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivos gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Reagentes e soluções .....	19
3.2. Procedimentos experimentais e instrumentação.....	20
3.3. Principais técnicas de caracterização .....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4.1. Comportamento da enzima PDH adsorvida na interface ar-água.....	23
4.2. Comportamento da enzima PDH incorporada em monocamadas de ácido esteárico .....	36
4.3. Estudos da atividade enzimática da PDH.....	51
5. CONCLUSÕES .....	53
6. REFERENCIAS.....	54
7. APÊNDICE .....	63



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Interfaces

O encontro de duas fases homogêneas e distintas (A e B) dá origem a uma região de tamanho finito e com características próprias que separa as fases, denominada interface. Nessa região, toda e qualquer propriedade intrínseca apresenta diferenças físicas e químicas quando comparadas com o interior das fases homogêneas. Por exemplo, ao se monitorar a variação da densidade molecular em um sistema constituído de uma fase gasosa em contato com uma fase líquida, conforme ilustrado na Figura 1, é possível observar que a densidade molecular do sistema apresenta uma descontinuidade em seu valor ao passar da região líquida para a fase gás, o que representa a interface entre essas fases.



**Figura 1** – Esquema do perfil de densidade em função da altura em um sistema contendo uma interface do tipo gás/líquido. Adaptado de (BARNES; GENTLE, 2004).

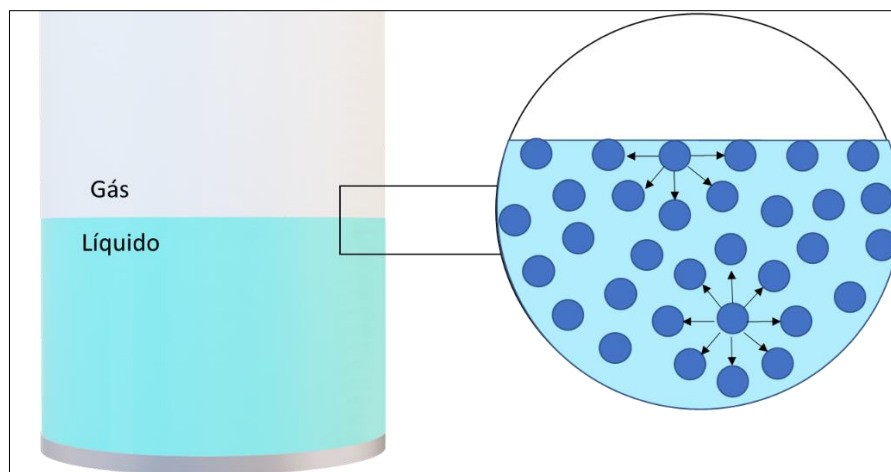
Os três principais estados físicos da matéria (sólido, líquido e gás) dão origem a cinco diferentes tipos de interface: 1- gás-líquido; 2- líquido-líquido; 3- sólido-sólido; 4- gás-sólido e 5- líquido-sólido. As duas primeiras interfaces são caracterizadas como fluidas, ao passo que as três últimas são interfaces caracterizadas como sólidas (ou não fluidas). Como misturas de gases sempre formam sistemas homogêneos em qualquer proporção, não existem interfaces do tipo gás-gás (SHAW, 2013).

Embora muitas vezes negligenciados do ponto de vista macroscópico, os fenômenos de interface podem se tornar tão relevantes a nível molecular que a ciência de interfaces pode ser considerada um tópico com importância própria dentro da Físico-Química. De fato, Irving Langmuir (Prêmio Nobel em 1932 por seu legado em Química de Superfícies), ao reconhecer a importância da ciência em duas dimensões, escreveu:

“[...] Hoje, proponho falar sobre a existência de um mundo bidimensional em que fenômenos análogos aos descritos no livro Planolândia: Um romance de muitas dimensões, ocorrem. Eu pretendo falar sobre o comportamento de moléculas e átomos que são mantidos na superfície de sólidos e líquidos.” (LANGMUIR, 1936, tradução nossa)

### 1.1.1 Adsorção em interfaces fluidas

Um dos conceitos mais importantes a ser levado considerado, principalmente no estudo de interfaces fluidas, é o da tensão desenvolvida entre as duas fases adjacentes. A Figura 2 apresenta um esquema das principais interações ocorrendo na interface entre duas fases fluidas do tipo gás-líquido. Verifica-se que a tensão ali desenvolvida tem origem no desequilíbrio de forças atrativas existentes entre as moléculas presentes na interface e aquelas encontradas no interior da fase líquida. Como consequência, a resultante das forças atuando sobre qualquer molécula presente na superfície sempre se direcionará para o interior do líquido, o que faz com que a contração de interfaces seja um processo espontâneo (a temperatura constante). O mesmo raciocínio também se aplica nos casos de interfaces fluidas do tipo líquido-líquido em que suas fases são imiscíveis.

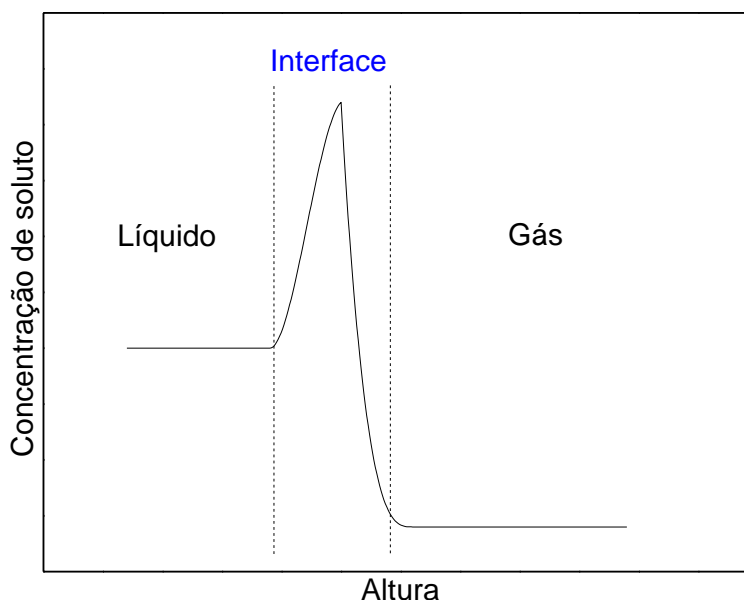


**Figura 2** - Esquema das principais interações ocorrendo entre moléculas no interior e na superfície de uma fase líquida. Adaptado de (BARNES; GENTLE, 2004).

Nesses casos, a contração da superfície é um processo espontâneo, e contribuirá para a minimização da energia livre de qualquer sistema que apresente uma interface. Portanto, é possível inferir que, no equilíbrio, a contribuição para a energia de Gibbs ( $G$ ) será função da tensão de superfície ( $\gamma$ ) e da área de contato ( $A$ ), conforme apresentado na equação 1. Nos casos em que duas fases são completamente miscíveis entre si,  $\gamma$  será negativo, e a diminuição de  $G$  será favorecida pelo aumento de  $A$  (as duas fases se dissolvem) (BARNES; GENTLE, 2004).

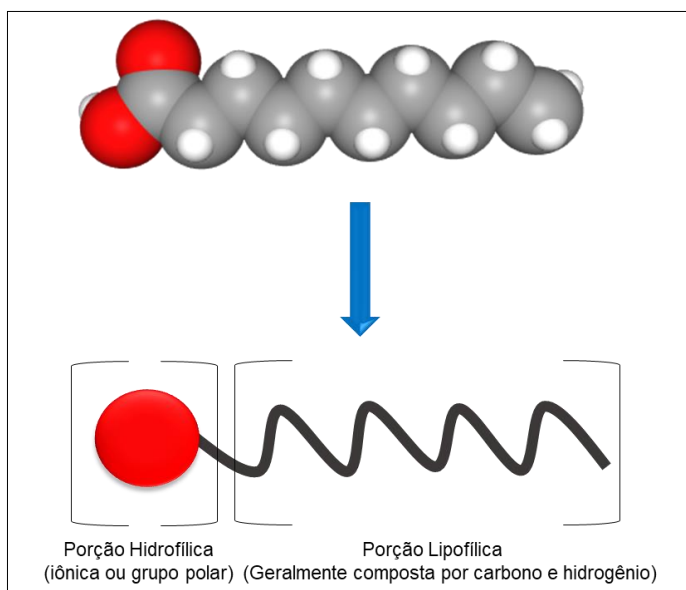
$$G = \gamma A \quad (1)$$

Processos que diminuem a tensão de superfície ( $\gamma$ ) também são considerados termodinamicamente favoráveis, e neste ponto o fenômeno da adsorção deve ser levado em conta. Conforme apresentado anteriormente, diferentes fases podem apresentar características físico-químicas completamente distintas, o que faz com que determinadas classes de compostos químicos apresentem preferência por uma fase ou outra. Todavia, a existência de compostos químicos com afinidade por ambas as fases (anfifílicos) faz com que o perfil de concentração de uma determinada substância seja maior na interface do que em qualquer uma das fases que lhe origina, fenômeno que é conhecido como “adsorção”, graficamente representado na Figura 3.



**Figura 3** – Perfil de concentração de um soluto anfifílico em função da altura na região de interface entre duas fases fluidas (interface do tipo gás/líquido). Adaptado de (BARNES; GENTLE, 2004).

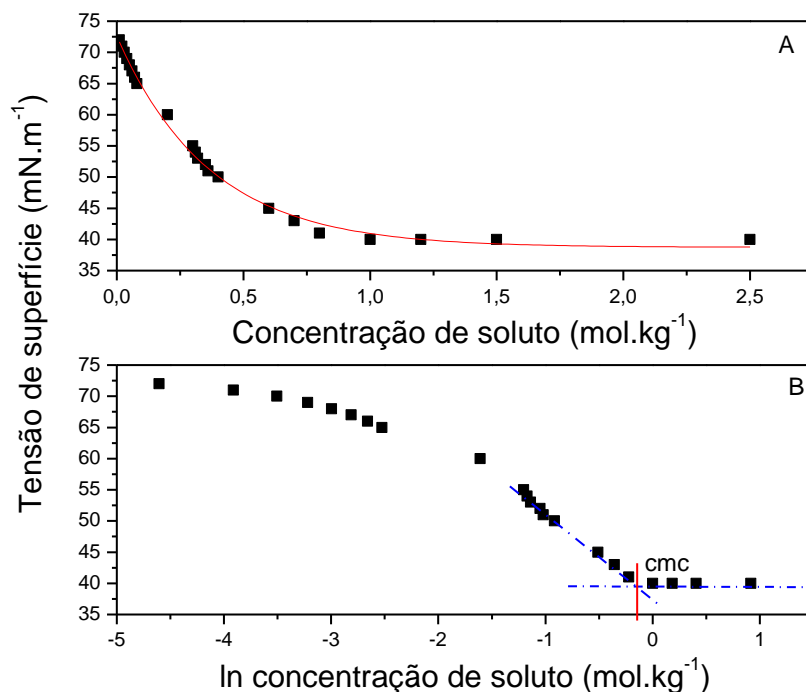
A classe de compostos anfifílicos (do grego: *anfi*=duas; *filico*=afinidade;) engloba o grupo de substâncias químicas que apresentam, na mesma molécula, um grupamento químico com maior afinidade por solventes polares (como água) e um grupamento com maior afinidade por solventes apolares (como óleos e gorduras). O segmento polar de um composto anfifílico é comumente denominado como hidrofílico, ao passo que o segmento apolar pode ser nomeado como oleofílico, lipofílico ou, mais comumente, hidrofóbico. A região polar de uma substância anfifílica pode ser classificada como iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou zwitteriônica (composto químico eletricamente neutro, mas que possui cargas opostas em diferentes átomos), ao passo que a região apolar é geralmente classificada do ponto de vista do número de cadeias (cadeia simples, cadeia dupla, etc.) e presença de insaturações (saturado ou insaturado). Um exemplo da representação esquemática pode ser visto na Figura 4.



**Figura 4** – Esquema da estrutura de uma molécula de material anfifílico. Adaptado de (SHAW, 2013).

### 1.1.2 Filmes monomoleculares em interfaces fluidas

A diminuição da tensão de superfície ( $\gamma$ ) em interfaces líquido-gás em uma solução de material anfifílico pode ser acompanhada como função de sua concentração ( $C_i$ ), e lançada em um gráfico do tipo  $\gamma$  versus  $C_i$ , conforme exemplificado na Figura 5A. Em regiões de baixa concentração do soluto, a relação entre  $\gamma$  e  $C_i$  (ou  $\log C_i$ ), sendo inversamente proporcionais. Isso significa que a adsorção de moléculas na interface é proporcional à concentração do composto. O limite da adsorção é atingido quando  $\gamma$  não mais se altera e pode-se dizer que a interface se encontra saturada pelo soluto adsorvido. No limite da saturação, um filme monomolecular (ou uma monocamada) do material se forma na interface entre a fase aquosa e a fase ar.



**Figura 5** – Perfil da tensão de superfície em função da concentração de um soluto anfifílico (A) e em função de seu logaritmo natural (B). Adaptado de (BARNES; GENTLE, 2004).

Qualquer quantidade adicional de soluto será imediatamente solubilizada na fase aquosa na forma de agregados denominados micelas, que se auto-organizam em solução espontaneamente. A concentração de soluto a partir da qual a tensão superficial da fase aquosa não mais se altera é denominada concentração micelar crítica (CMC), conforme exemplificado no gráfico 5B. O principal fator que governa a solubilidade de um composto anfifílico em água é o balanço entre seus grupos polar e apolar, denominado balanço hidrofílico-lipofílico. Filmes monomoleculares que se formam pela adsorção de compostos com certa solubilidade em água são denominados monocamadas de Gibbs e podem ter sua adsorção,  $\Gamma$ , estimada através da equação 2:

$$\Gamma_i = -\frac{C_i}{RT} \frac{d\gamma}{dC_i} \quad (2)$$

Nesta equação,  $R$  é constante universal dos gases perfeitos (ideais),  $T$  é a temperatura absoluta. O termo  $\Gamma$  representa a densidade superficial molar do componente “i” na interface (BARNES; GENTLE, 2004; SHAW, 2013).

Nos casos extremos em que um composto apresenta um balanço hidrofílico-lipofílico baixo (maior contribuição lipofílica), sua solubilidade em água é tão baixa que sua depleção total na fase aquosa pode ser considerada, e, assim, o composto “i” deve permanecer somente na interface. O filme que é então formado na interface é constituído por um material insolúvel em água, e apresenta importância própria em estudos

de superfícies, pois guarda uma relação mínima com as fases que o mantém. No ano de 1917, o cientista norte americano Irving Langmuir descreveu detalhadamente o grau de alcance das forças de Van der Waals existentes entre as moléculas de materiais anfifílicos, bem como a sua orientação na interface ar/água (LANGMUIR, 1917), sendo contemplado anos mais tarde com o prêmio Nobel de Química no ano de 1932 por sua importante contribuição para a química de superfícies. Assim, em contrapartida às monocamadas formadas por solutos com certa solubilidade em água (monocamadas de Gibbs), os filmes formados pela completa depleção de materiais anfifílicos numa interface do tipo ar/água foram nomeados como filmes de Langmuir (ou monocamadas de Langmuir), ou, menos frequentemente, como filmes de Pockels-Langmuir. (BARNES; GENTLE, 2004).

### 1.1.3 Formação de filmes de Langmuir

A formação de filmes de Langmuir estáveis é feita por meio de um compartimento conhecido como “cuba”, que é usualmente preenchida com água. Essa cuba é um recipiente que possui habitualmente forma de paralelepípedo, e é constituída por paredes internas de material inerte (geralmente Teflon®). A formação da monocamada de anfifílicos insolúveis ocorre na etapa de espalhamento do material na interface. Para facilitar o espalhamento, o procedimento ocorre a partir de soluções orgânicas e voláteis do anfifílico, que são depositadas gota a gota sobre a superfície da água. É importante que o solvente utilizado tenha um coeficiente de espalhamento positivo e seja também insolúvel em água (normalmente se usa clorofórmio ou éter etílico). Com o auxílio de uma microsseringa, deposita-se cuidadosamente um volume conhecido da solução na interface (comumente na ordem de  $\mu\text{L}$ ). Após a deposição, a solução deve se espalhar uniformemente sobre a interface devido à adesão das regiões hidrofílicas à interface aquosa e a repulsão lateral dos grupamentos hidrofóbicos e hidrofílicos. Se a quantidade de material for suficientemente pequena em relação à área de interface, o material formará um filme de espessura monomolecular, no qual as regiões hidrofílicas estarão adsorvidas à interface aquosa, e as regiões hidrofóbicas estarão voltadas para a fase do ar.

Um parâmetro importante para a formação dos filmes de Langmuir é a sua densidade molecular superficial, expressa pela área média disponível por molécula na interface. A área total (A) da interface disponível para o filme é conhecida e pode ser modulada com o auxílio de barreiras móveis que podem comprimir ou descomprimir a monocamada, permitindo sua compressão ou expansão. Calcula-se então o número de moléculas depositadas ( $N_m$ ), e assume-se que todas se distribuam homogeneamente em toda a extensão da interface, o que permite estimar a área média ( $A_m$ ) por molécula no filme através da equação 3:

$$A_m = \frac{A}{N_m} \quad (3)$$

Um tensiômetro acoplado à cuba de Langmuir permite que variações na tensão de superfície da fase aquosa sejam mensuradas. Diferentes métodos podem ser utilizados para detectar variações na tensão superficial de interfaces do tipo gás-líquido. Cabe aqui mencionar o método desenvolvido por Ludwig Wilhelmy, que encontrou amplo uso no processo de mensuração da tensão superficial. Nesta técnica, um sensor com poucos centímetros quadrados feito de algum material hidrofílico (normalmente platina ou papel de filtro) é posicionado de forma que fique em contato com a interface orientado perpendicularmente a ela, e pendurado através de uma microbalança mecânica. As forças de adesão da água sobre o sensor permitem seu completo umedecimento, formando um ângulo de contato  $\theta$ . A força,  $F$ , pode ser medida através do fio que conecta o sensor à microbalança, e, assim, a partir da equação 4, pode-se determinar a tensão na superfície de um líquido:

$$\gamma = \frac{F}{l \cos \theta} \quad (4)$$

A grandeza “ $l$ ” consiste no perímetro de contato entre o menisco formado pelo líquido e o sensor, e pode ser estimado como  $l = 2w + 2d$ , onde  $w$  e  $d$  são a largura e espessura do sensor, respectivamente. O ângulo de contato, por sua vez, pode ser difícil de determinar na prática, e geralmente assume-se  $\theta = 0$  (umedecimento completo). A Figura 6 apresenta uma cuba utilizada na preparação de filmes de Langmuir.



**Figura 6** – Modelo de cuba utilizada na construção e estudo de filmes de Langmuir. Fonte: o autor, 2020.

A compressão do material por barreiras móveis eleva sua concentração na interface, o que produz a uma diminuição no valor da tensão superficial inicial da água pura ( $\gamma_0$ ). A diferença entre a tensão de superfície inicial da água ou solução aquosa ( $\gamma_0$ ) e a sua tensão após o aumento da concentração do surfactante ( $\gamma$ ) é denominada pressão de superfície ( $\pi$ ), conforme apresentado na equação 5:

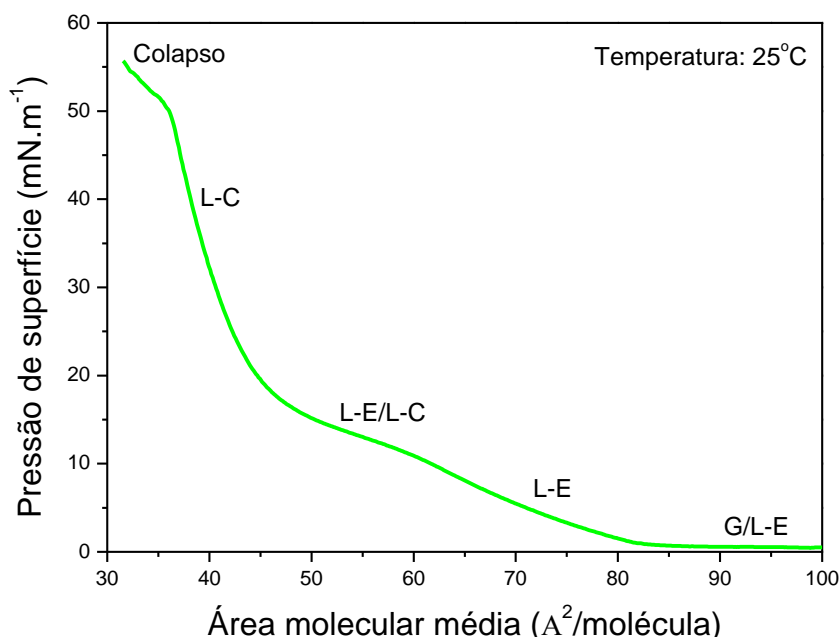
$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (5)$$

## 1.2 Principais técnicas de caracterização

Os filmes de Langmuir dispõem de diversas técnicas que permitem uma melhor compreensão acerca de seus parâmetros físicos. Destacam-se aqui os diagramas de pressão de superfície-área e potencial de superfície-área, bem como análises reológicas em regime estático e dinâmico dos módulos viscoso e elástico.

### 1.2.1 Isotermas pressão de superfície-área

O monitoramento da variação da pressão de superfície ( $\pi$ ) ao longo da compressão de uma monocamada a temperatura constante produz um diagrama denominado isoterma de pressão de superfície-área ( $\pi$ -A), e consiste na forma mais clássica em termos de caracterização dos filmes de Langmuir (BARNES; GENTLE, 2004). De um modo geral, o perfil de uma isoterma permite identificar, convencionalmente, até quatro fases para uma monocamada: uma fase gasosa (G), duas fases líquidas, líquido-expandida (L-E) e líquido-condensada (L-C), e uma fase condensada (ou sólida). Transições de primeira ordem ocorrem entre os estados gasoso e líquido-expandido e também entre os estados líquido-expandido e líquido-condensado, ao passo que transições de segunda ordem existem somente entre os estados líquido-condensado e condensado (ou sólido). O colapso de uma monocamada é caracterizado pela expelimento de material anfifílico da região de interface para a fase ar ou água, produzindo estruturas tridimensionais (multicamadas). As principais fases apresentadas por uma monocamada de Langmuir são ilustradas na Figura 7.



**Figura 7** – Exemplo do perfil de compressão isotérmica observado para o fosfolípido DPPC. Fonte: o autor, 2020.



### 1.2.2 Isotermas potencial de superfície-área

Assim como as isotermas de pressão de superfície-área, as isotermas de potencial de superfície-área são determinadas em relação à superfície de uma subfase aquosa na presença ou ausência de uma monocamada. A diferença de potencial ( $\Delta V$ ) em uma interface recoberta por um filme monomolecular pode ser entendida como à soma das contribuições dos dipolos de moléculas de água reorientadas na interface ( $\mu_1$ ), bem como as contribuições dos dipolos presentes na interface água-filme ( $\mu_2$ ) e na interface ar-filme ( $\mu_3$ ), conforme apresentado na equação 6:

$$\Delta V = \frac{1}{A\epsilon_0} \left( \frac{\mu_1}{\epsilon_1} + \frac{\mu_2}{\epsilon_2} + \frac{\mu_3}{\epsilon_3} \right) + \psi_0 \quad (6)$$

No qual, o fator  $\psi_0$  representa a contribuição da dupla camada de Gouy-Chapman (DAVIES, 1951, 1956), formada quando o filme é constituído por materiais com grupos ionizáveis. A utilização de fosfolipídios e biomoléculas carregadas faz com que o termo  $\psi_0$  apresente maior contribuição no valor de  $\Delta V$  nos casos em que a área disponível ( $A$ ) é grande o suficiente, pois a contribuição dos momentos de dipolo nesse estado deve ser negligenciada. Os valores de  $\mu_i$  representam a projeção do momento de dipolo de cada grupo ao eixo normal à interface. Portanto, uma orientação aleatória, esperada em baixas densidades superficiais moleculares, deve anular a contribuição relativa aos momentos de dipolo.

Como a ordenação dos momentos de dipolos é normalmente inversamente proporcional à área média ocupada pelas moléculas do filme na interface, verifica-se que para altas áreas por molécula, o potencial de superfície devido à presença do filme é praticamente zero, se excluindo a contribuição de  $\psi_0$ . A compressão do filme faz com que suas moléculas se reorganizem na interface, e a partir de determinada área crítica, o potencial de superfície deixa de ser nulo. Em alguns casos, o potencial pode atingir um patamar característico de um filme com alta organização. A principal vantagem das isotermas  $\Delta V$ - $A$  sobre as isotermas  $\pi$ - $A$  é que a área crítica é invariavelmente maior em comparação àquela em que a pressão de superfície deixa de ser nula. Isso, portanto, significa que o potencial de superfície é mais sensível à organização dos filmes de Langmuir.

### 1.2.3 Análises reológicas

A partir das isotermas  $\pi$ - $A$ , pode-se obter uma propriedade mecânica no filme conhecida como elasticidade superficial ( $C_s^{-1}$ ), também denominada fator (ou módulo) de compressibilidade (ou de compressão) bidimensional. À temperatura constante,  $T$ , ela pode ser calculada através da equação 7:

$$C_s^{-1} = -A \left( \frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad (7)$$

O acompanhamento da variação da elasticidade apresentada por uma monocamada ao longo de sua compressão pode ser obtido em regime estático ou dinâmico, e é de grande importância quando se deseja avaliar a resistência de um filme frente a sua compressão. Os valores quantitativos de  $C_s^{-1}$  são obtidos a partir da inclinação das isothermas  $\pi$ -A, e possuem dependência direta com os diferentes estados de compactação de uma monocamada (ALI et al., 1998; BEHROOZI, 1996; GONG et al., 2002; LUCASSEN; VAN DEN TEMPEL, 1972), apresentando maiores valores para sistemas mais condensados, onde pequenas variações na área do filme produzem grandes alterações em sua elasticidade, conforme apresentado na tabela 1. Altos valores de  $C_s^{-1}$  representam, portanto, um maior efeito no aumento na pressão superficial devido ao processo de deformação mecânica (compressão lateral), indicando um filme mais elástico, ou seja, mais sensível ao estímulo (menos compressível), possuindo estados de empacotamento mais rígidos.

**Tabela 1** – Correlação entre o módulo de compressibilidade ( $C_s^{-1}$ ) e a fase bidimensional apresentada por uma monocamada. Dados adaptados de (DAVIES; RIDEAL, 1961).

Valores de $C_s^{-1}$ (mN.m <sup>-1</sup> )	Fase da monocamada
0 - 12.5	Gasosa
12.5 - 50	Líquido-expandida
50 - 100	Indefinido
100 - 250	Líquido-condensada
> 250	Condensada (Sólida)
0 ou < 1	Colapso ou Transição de fase

Outra forma de determinar o módulo de compressão de uma monocamada é realizar experimentos em regime dinâmico, onde diferentes métodos podem ser aplicados. Os mais comuns para filmes de Langmuir são: o método da gota pendente oscilante, barreiras oscilantes, e agulha flutuante oscilante. Em todos os casos, a aplicação de uma tensão de cisalhamento (estímulo) oscilatória e de baixa frequência, produz respostas também oscilatórias e de mesma frequência. Caso as fases entre estímulo e resposta coincidam, pode-se afirmar que o filme é puramente elástico, do contrário, a existência de diferença de fase indica a existência de fenômenos de natureza viscosa. A equação 8 fornece a relação entre a soma das contribuições puramente elásticas ( $E'$ ) e puramente viscosas ( $E''$ ) de um sistema, com um ângulo de atraso de fase  $\varphi$ , resumidas como um novo parâmetro, denominado módulo complexo viscoelástico ( $E^*$ ) (LUCASSEN; VAN DEN TEMPEL, 1972):

$$E^* = E' \cos \varphi + iE'' \sin \varphi \quad (8)$$

#### 1.2.4 Técnicas espectroscópicas

Muitas vezes, busca-se uma melhor compreensão das características físicas dos filmes de Langmuir em nível molecular, o que faz com que técnicas mais avançadas de caracterização, como, por exemplo,

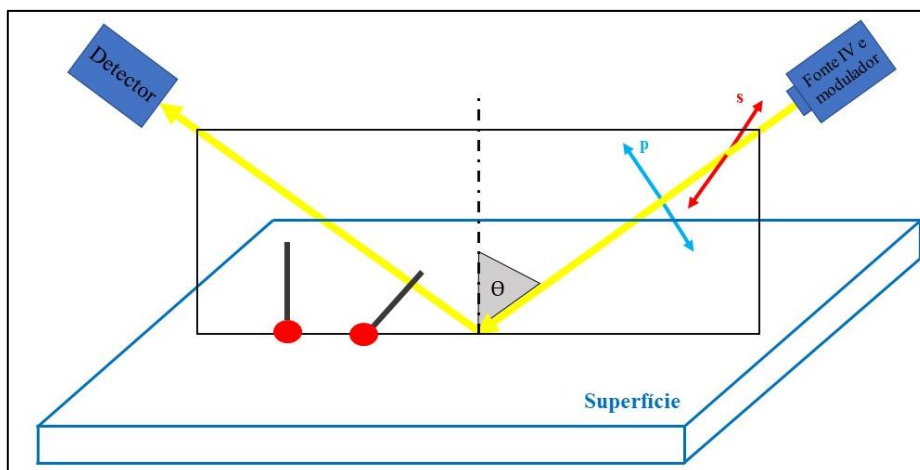
aquelas que envolvem a interação da luz com a matéria, sejam empregadas. Destaca-se aqui a utilização da espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com modulação da luz polarizada (PM-IRRAS), técnica desenvolvida especialmente para o estudo de fenômenos ocorrendo em superfícies.

A espectroscopia no infravermelho baseada na reflexão da luz (IRRAS) foi desenvolvida no ano de 1966, por Greenler (GREENLER, 1966) e consiste em um método de análise com elevada sensibilidade à orientação de moléculas suportadas em substratos sólidos e altamente refletivos (p.e. placas metálicas) (GREENLER, 1966; VOLPATI et al., 2014). Ao longo dos anos, as análises espectroscópicas baseadas na reflexão se desenvolveram, dando origem a novas derivações da técnica desenvolvida por Greenler. Dentre os diferentes ramos da espectroscopia refletiva, pode-se citar a espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho com modulação da luz polarizada (PM-IRRAS) como a técnica de maior aplicabilidade no estudo dos filmes de Langmuir (BLAUDEZ et al., 1992). Neste modo, o feixe de onda eletromagnética que incide na superfície analisada é polarizado e modulado em suas componentes p (paralela ao plano normal da interface) e s (perpendicular ao plano normal da interface). O feixe é refletido pela interface e captado pelo detector, capaz de distinguir as duas frações da luz polarizada (p e s). A diferença entre as refletividades das ondas p e s ( $R_p - R_s$ ) dividida pela sua soma ( $R_p + R_s$ ) resulta na quantidade denominada ( $\Delta S$ ) conforme a equação 9:

$$\Delta S = \frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)} \quad (9)$$

O feixe p-polarizado é absorvido por moléculas com transições vibracionais cujos momentos sejam tanto isotrópicos como anisotrópicos, ao passo que o feixe s-polarizado é absorvido somente moléculas cujos momentos de transição são isotrópicos. Isso dá origem à regra da seleção do PM-IRRAS uma vez que a quantidade  $R_p - R_s$  deve eliminar a interferência isotrópica e expressar a absorvidade somente de meios anisotrópicos, ou seja da superfície. Além disso, o feixe p-polarizado é mais fortemente absorvido que o feixe s-polarizado acima do ângulo de Brewster, e então a distinção da orientação relativa dos diferentes grupos em superfície torna-se proporcional à intensidade relativa das bandas em relação à linha base (VOLPATI et al., 2014). Assim, com a incidência acima do ângulo de Brewster, bandas negativas em relação à linha base do espectro indicam orientações do momento de transição perpendiculares à interface e as bandas positivas, por sua vez, indicam orientações do momento de transição paralelas à interface. Dipolos aleatoriamente orientados na superfície possuem bandas que se anulam, o que permite que a contribuição do sinal de moléculas aleatoriamente orientadas que estejam no caminho óptico (vapor de água, CO<sub>2</sub> e metano) seja minimizada, reduzindo possíveis fontes de ruído (MENDELSON; BRAUNER; GERICKE, 1995). A Figura 8 apresenta o esquema do funcionamento de um espectrofotômetro operando no modo PM-IRRAS.

A subtração matemática do espectro de referência da superfície água limpa, do espectro na presença da monocamada, ou seja,  $\Delta S_{\text{filme+água}} - \Delta S_{\text{água}}$ , permite que os efeitos de absorção de energia radiante por moléculas de água superficialmente orientadas sejam atenuados. A detecção do feixe refletido pela superfície ocorre no receptor, a partir do qual um espectro ( $\Delta S$  versus número de onda) é gerado computacionalmente. A técnica PM-IRRAS, portanto, é especialmente útil para filmes de Langmuir, pois permite que o fraco sinal de absorção da monocamada seja livre de possíveis sinais interferentes, como a fase líquida e o ar, o que seria impraticável no modo usual de transmissão, dado que sinais de água, gás carbônico e metano interfeririam, pois essas substâncias estão invariavelmente presentes no caminho óptico.



**Figura 8** - Esquema do funcionamento de um espectrofotômetro operando no modo PM-IRRAS. Fonte: o autor, 2020.

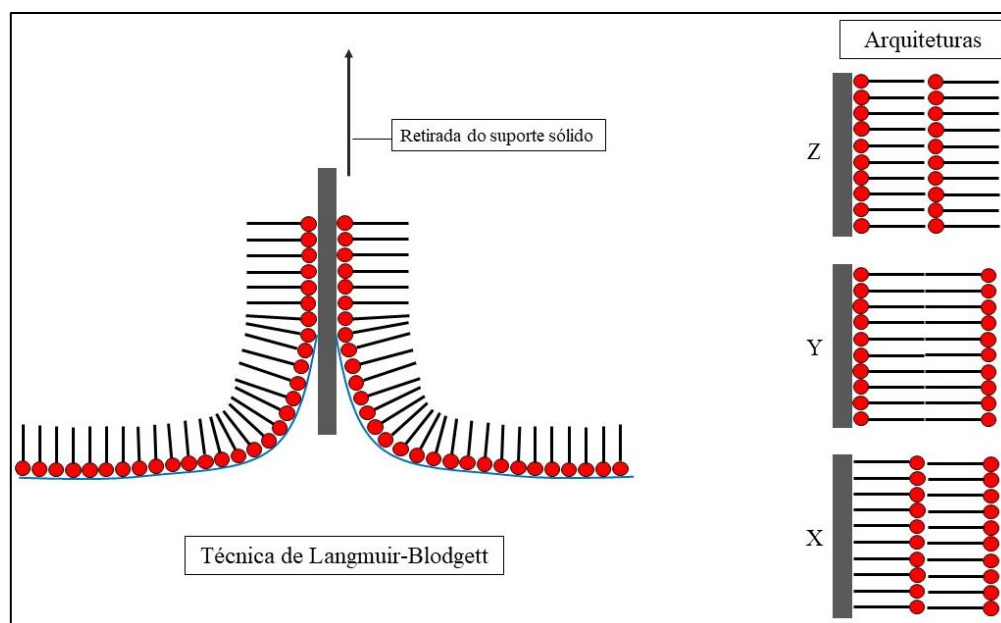
### 1.2.5 Técnicas microscópicas

Além da análise estrutural derivada da espectroscopia no infravermelho, é possível também estudar as transições de fase e os diferentes domínios formados na interface ar-água referentes às monocamadas. Para isso, diferentes técnicas de microscopia têm sido aplicadas, como a microscopia no ângulo de Brewster (BAM) ou a microscopia por epifluorescência (PAVINATTO, 2016). A primeira técnica se baseia na incidência de um feixe  $p$  polarizado com um ângulo de  $53^\circ$  em relação ao plano normal com a interface (ângulo de Brewster), no qual nenhuma refletância é observada. A presença de um material surfactante na interface leva a uma mudança significativa de refletividade por variação dos índices de refração e reflexão entre as diferentes fases existentes. Dessa maneira, as condições anteriores deixam de ser obedecidas e diferentes imagens são formadas por contraste entre as regiões que passam a refletir mais ou menos luz (VOLLHARDT, 2014). A técnica de epifluorescência, assim como a microscopia no ângulo de Brewster, também gera imagens por contraste na região de interface, mas neste caso imagens são geradas a partir da fluorescência de um composto espalhado na interface junto da monocamada, denominado fluoróforo

(MATSUOKA et al., 2014). Assim, se esse fluoróforo apresentar maior afinidade por uma das fases, a técnica permitirá a distinção entre diferentes domínios superficiais.

### 1.3 Imobilização de monocamadas insolúveis em suportes sólidos

Existem diversas técnicas disponíveis atualmente que permitem o recobrimento da superfície de suportes sólidos a partir da imobilização física ou química de diferentes compostos. A técnica de Langmuir-Blodgett em específico, envolve a passagem de um suporte sólido através de uma interface recoberta por uma monocamada de Langmuir previamente formado, levando à adesão do material à nova superfície abreviado como filme LB (BLODGETT, 1934). As condições de deposição dependem de muitos fatores, como: natureza da monocamada, pH da solução, conteúdo iônico do meio, e a velocidade de imersão e retirada do suporte sólido da subfase aquosa, bem como a sua hidrofilicidade ou hidrofobicidade (DICKO; BOURQUE; PÉZOLET, 1998). A técnica de Langmuir-Blodgett permite o controle preciso da espessura e da arquitetura dos filmes transferidos. Três tipos diferentes de arquitetura de deposição podem existir caso haja multipassagens do suporte sólido pela monocamada, denominadas X, Y ou Z. Em arquiteturas do tipo Y os filmes são transferidos tanto nos movimentos de subida do suporte quanto nos movimentos de descida, que ocorrem de forma alternada. Já as arquiteturas dos tipos X e Z apresentam transferências bem sucedidas somente nos processos de subida ou descida do substrato, respectivamente. A Figura 9 apresenta o exemplo do processo de transferência de um material anfifílico para a superfície de um suporte sólido, bem como as diferentes arquiteturas que podem ser obtidas através da técnica.



**Figura 9** – Exemplo do processo de transferência de um material anfifílico para a superfície de um suporte sólido e as diferentes arquiteturas possíveis para os filmes de Langmuir-Blodgett. Adaptado de (ZASADZINSKI et al., 1994).

#### 1.4 Principais aplicações para filmes de Langmuir

A principal aplicação atribuída aos filmes de Langmuir é consequência direta da organização apresentada pelas moléculas de um filme em seu estado condensado, que apresenta semelhança direta com a primeira metade de uma bicamada lipídica e permite que estes filmes encontrem vasta aplicação na mimetização de interfaces biológicas (BROCKMAN, 1999). Além disso, a grande disponibilidade de técnicas *in situ* disponíveis para a caracterização filmes finos permite o acompanhamento imediato dos sistemas em estudo (NOBRE et al., 2015).

Exemplos clássicos envolvem frequentemente estudos do comportamento interfacial e da termodinâmica de formação de filmes puros (DICKO; BOURQUE; PÉZOLET, 1998; YUN et al., 2003) e de filmes binários ou ternários entre fosfolipídios de diferente natureza (OHTA et al., 2004) e sistemas envolvendo a mistura de fosfolipídios de membrana e lipídios esteroidais de importância biológica, como por exemplo o colesterol (DEWITT; DUNN, 2015; SABATINI; MATTILA; KINNUNEN, 2008).

Além disso, a diminuição do número de variáveis em relação à sistemas reais permite frequentemente que a técnica de Langmuir seja também utilizada para melhorar a compreensão em mecanismos de interação específicos ocorrendo entre diferentes compostos e membranas biológicas. Exemplos diversos envolvem o estudo de diferentes fármacos (GERALDO et al., 2013; HAAS et al., 2001), antifúngicos (ARIMA et al., 2014), antiparasitários (BARBOSA et al., 2020; HERCULANO et al., 2011), poluentes (BAKSHI et al., 2008; KANNO; FURUYAMA; HIRANO, 2008), nanopartículas (ÁBRAHÁM et al., 2014; CHEN; BOTHUN, 2014) e até macromoléculas como proteínas e enzimas (REYES et al., 2012; SCHMIDT et al., 2008a).

#### 1.5 Principais aplicações para filmes de Langmuir-Blodgett

Os filmes de Langmuir-Blodgett, por sua vez, encontram ampla aplicação no recobrimento de superfícies sólidas para a produção de materiais com propriedades físicas melhoradas, como por exemplo, o recobrimento de superfícies vítreas com estearatos metálicos para a produção de vidros de alta refletividade, técnica desenvolvida e patenteada por Katherine B. Blodgett em 1938.

Além da utilização de anfifílicos clássicos para produção de filmes LB, as aplicações mais recentes da técnica envolvem o estudo da deposição de diferentes macromoléculas para a produção de estruturas supramoleculares com possíveis aplicações em diferentes frentes da nanotecnologia. Exemplos de estudos recentes buscam imobilizar compostos sintéticos ou naturais com elétrons  $\pi$  deslocalizados, como por exemplo a utilização de polímeros conjugados voltados à produção de dispositivos com propriedades ópticas e eletrônicas moduláveis (FERREIRA et al., 2007; OLIVATI et al., 2008; SAKAI et al., 2011) para a produção de LEDs (GUO; BAUMGARTEN; MÜLLEN, 2013; GUSTAFSSON et al., 1992; MITEVA et

al., 2001), *displays* flexíveis (FORREST, 2004), sensores (MALHOTRA; CHAUBEY; SINGH, 2006; TYLER MCQUADE; PULLEN; SWAGER, 2000) e células solares (GADISA et al., 2007; GÜNES; NEUGEBAUER; SARICIFTCI, 2007; SVENSSON et al., 2003).

A co-imobilização de enzimas em matrizes de materiais surfactantes constitui uma técnica frequentemente utilizada na produção de estruturas bioinspiradas com potencial aplicação em nanobiotecnologia através da produção de sensores altamente seletivos (CASELI, 2018). Muitos compostos importantes do metabolismo humano foram anteriormente identificados utilizando filmes LB de enzimas imobilizadas, como por exemplo a ureia (CASELI et al., 2008), o ácido úrico (ZANON; OLIVEIRA; CASELI, 2012) e a glicose (SINGHAL et al., 2004). Os dispositivos produzidos utilizam o poder catalítico da enzima para a produção de sinais ópticos ou elétricos proporcionais à concentração do analito, com a vantagem especial da preservação da atividade dos filmes por longos períodos de tempo (AYOUB; CASELI, 2017; RODRIGUES; CAMILO; CASELI, 2014).

### **1.6 Fenilcetonúria no Brasil e detecção da L-fenilalanina**

A fenilcetonúria é uma doença genética caracterizada pela inatividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), encontrada no fígado humano. Essa enzima catalisa a conversão (hidroxilação) da fenilalanina em tirosina pela transferência de um átomo de oxigênio para o anel aromático da fenilalanina. Posteriormente, um íon hidrogênio ( $H^+$ ) liga-se ao oxigênio, completando a conversão em tirosina, de acordo com o esquema apresentado na Figura 10A. Indivíduos com a enzima PAH inativa (ou pouco funcional) podem apresentar elevados níveis sanguíneos de fenilalanina. Quando em quantidades elevadas, o aminoácido é prontamente convertido a ácido fenilpirúvico, um composto altamente tóxico que pode causar danos irreversíveis a células do sistema nervoso central, comprometendo assim o desenvolvimento neurofisiológico de crianças até os 7 anos de idade (CHANDLER et al., 1982). A intervenção dietética para pacientes com essa enfermidade é de extrema importância, pois reduz as chances de desenvolvimento para casos mais graves (atraso mental). Assim, o diagnóstico precoce, e confiável, da fenilcetonúria é crucial tanto para a sua prevenção quanto para o seu tratamento.

Segundo dados do site do Ministério da Saúde, a incidência de casos de fenilcetonúria no Brasil varia entre 1/15.000 a 1/25.000 nascidos vivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A doença é detectada na triagem neonatal, obrigatória desde 1990 (lei 8.069/1990 do Estatuto da Criança e do Adolescente) pelo “teste do pezinho”, que mede os níveis de fenilalanina em amostras de sangue seco embebido em papel filtro, com resultado positivo para concentrações superiores a 10 mg/dL do aminoácido (DE MARQUI, 2016). No ano de 2001, o Ministério da Saúde criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (Portaria número 822 de 06 de Junho de 2001) que garante que todos os estados brasileiros devem contar

com um Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN), além de postos de coleta distribuídos por todos os municípios do estado. O SRTN compreende um laboratório especializado responsável pela confirmação do diagnóstico, acompanhamento e o auxílio no tratamento de casos diagnosticados (NEONATAL, 2004).

O primeiro diagnóstico da fenilcetonúria a ser amplamente difundido foi proposto por Robert Guthrie e Ada Susi em 1963 (GUTHRIE; SUSI, 1963). A partir de testes colorimétricos baseados em inibição bacteriana, o teste desenvolvido por Guthrie é semi-quantitativo, e não permite determinar a concentração do aminoácido em pacientes. Além disso, sua baixa precisão e o grande número de falsos positivos têm incentivado a busca pelo desenvolvimento de novos métodos na detecção rápida e seletiva da fenilalanina (HILL et al., 1965).

Outro método amplamente utilizado no diagnóstico e no monitoramento da fenilcetonúria em pacientes foi desenvolvido em 1962 por McCaman e Robins (MCCAMAN; ROBINS, 1962) e utiliza o acompanhamento da fluorescência do produto de reação entre a fenilalanina e a ninidrina na presença de cobre a partir da adição de quantidades crescentes do dipeptídeo L-leucil-L-alanina. O teste desenvolvido por McCaman e Robins apresenta a principal desvantagem da interferência de muitos aminoácidos e contaminantes em níveis traço, o que resultou na produção de muitos trabalhos visando o desenvolvimento de alternativas com menores fontes de incerteza no diagnóstico fluorimétrico da hiperfenilalaninemia (AMBROSE et al., 1967; WONG; O'FLYNN; INOUE, 1964).

Entre as décadas de 80 e 90 os ensaios colorimétricos utilizando reações enzimáticas ganharam atenção frente aos testes fluorimétricos devido a sua excelente especificidade, sensibilidade aceitável e a facilidade no processo de automação dos resultados (HUMMEL; SCHÜTTE; KULA, 1988; WENDEL et al., 1990; WENDEL; HUMMEL; LANGENBECK, 1989). Simultaneamente, diferentes métodos analíticos por cromatografia também foram propostos como alternativas na quantificação do aminoácido (ATHERTON, 1989; BOURGUE; KRULL, 1991) porém, apesar de produzirem resultados com excelente confiabilidade, geralmente requerem instrumentação cara e o uso de solventes em altas quantidades, o que resulta também em um elevado custo por análise (GIROTTI et al., 1993).

Os estudos mais recentes fazem amplo uso da nanobiotecnologia na imobilização de enzimas em estruturas supramoleculares para a produção de biossensores. De um modo geral, um biossensor é um dispositivo capaz de produzir um sinal óptico ou eletrônico diretamente proporcional à concentração de seu analito, com as vantagens de apresentar seletividade e sensibilidade excepcionais além de seu baixo custo de produção e operação (MEHROTRA, 2016). Diferentes estratégias para a imobilização de enzimas relacionadas ao metabolismo da L-fenilalanina têm sido propostas, apresentando em sua grande maioria a

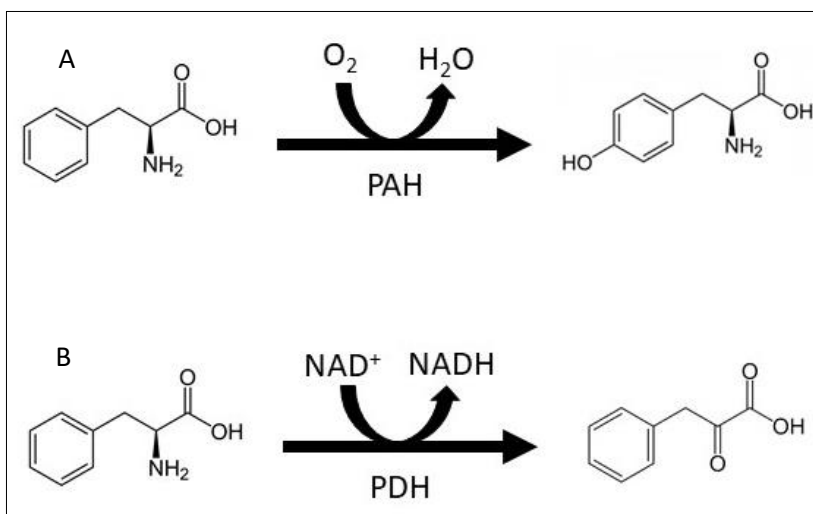


fenilalanina desidrogenase (PDH) como candidata principal (GUBICA et al., 2015; TARHAN; AYAR-KAYALI, 2011; WEISS et al., 2007).

O processo de imobilização pode ser feito por meio de adsorção (OMIDINIA; SHADJOU; HASANZADEH, 2014a; VILLALONGA et al., 2007) ou pela ligação covalente da enzima em estruturas híbridas com compostos orgânicos e inorgânicos (NAGHIB; RABIEE; OMIDINIA, 2014; OMIDINIA et al., 2013, 2015; OMIDINIA; SHADJOU; HASANZADEH, 2014b; VILLALONGA et al., 2008) para o recobrimento e funcionalização de diferentes superfícies. Até o presente momento, e no melhor de nosso conhecimento, nenhuma enzima relacionada ao estudo da fenilalanina foi imobilizada e estudada a partir do ponto de vista dos filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Assim, o projeto atual escolheu o ácido carboxílico como matriz para a imobilização da enzima fenilalanina desidrogenase. Tal escolha baseou-se no fato de o HSt constituir um sistema simples, barato e de fácil deposição em multicamadas, sendo assim amplamente aplicado na imobilização de enzimas para a produção de filmes LB (ARAUJO; PERES; CASELI, 2019; PAL; NANDI; MISRA, 1994; ZANON; OLIVEIRA; CASELI, 2012).

### **1.7.Fenilalanina desidrogenase (PDH)**

A PDH pertence à classe das oxidoreductases e é responsável pela reação reversível de desaminação oxidativa da L-fenilalanina à fenilpiruvato na presença de  $\text{NAD}^+$  como cofator (ASANO; NAKAZAWA; ENDO, 1987), de acordo com o esquema apresentado na Figura 10B. A enzima existe em diferentes variações dentro de uma longa gama de estruturas e pesos moleculares. As espécies de bactérias *Sporosarcina*, *Bacillus* e *Microbacterium* produzem enzimas octaméricas, enquanto as espécies *Rhodococcus*, *R. Maris* e *Nocardia* produzem variações tetraméricas, diméricas e monoméricas, respectivamente. Seu peso molecular varia de 42.000 (*Nocardia*) a 331.480 Daltons (*B. Sphaericus*) com um pH ideal para a desaminação oxidativa da L-fenilalanina entre 10.4 e 11.3.



**Figura 10** – Conversão do aminoácido L-fenilalanina à tirosina pela ação da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (A) e sua conversão à ácido fenilpirúvico pela ação da fenilalanina desidrogenase (B). Fonte: o autor, 2020.

Além de diferentes estruturas e pesos moleculares, a classe das enzimas PDH também apresenta grandes diferenças na especificidade do seu principal substrato. A constante de Michaelis-Menten (Km) é uma constante de velocidade aparente utilizada como parâmetro na determinação da afinidade de uma enzima por seu substrato. Um Km com valor relativamente baixo, indica uma maior interação enzima/substrato (AVASHIA; THALLER, 2011). Enquanto a PDH produzida por *B. badius* e *S. ureae* apresenta elevada especificidade pela L-fenilalanina (baixo Km aparente), a PDH produzida por *B. Sphaericus*, por exemplo, apresenta melhor afinidade para a reação oxidativa da L-tirosina (ASANO, 2010). Assim, a microdeterminação de L-phe é geralmente feita a partir de enzimas nativas a partir de culturas *B. badius* e *S. ureae* ou de suas mutantes expressas em bactérias *E. Coli*. A tabela 2 apresenta um resumo dos principais microorganismos utilizados na obtenção da enzima PDH.

**Tabela 2** - Resumo das principais propriedades físico-químicas da enzima fenilalanina desidrogenase obtida de diferentes microorganismos. Dados adaptados de (ASANO, 2010).

Propriedade	Microorganismo						
	<i>B. sphaericus</i>	<i>S. ureae</i>	<i>B. badius</i>	<i>R. maris</i>	<i>Norcadia sp.</i>	<i>T. intermedius</i>	<i>Microbacterium sp.</i>
Atividade específica (U/mg)	111	84	68	65	30	86	37
Peso molecular (filtração por gel/ kDa)	340	310	335	70	42	270	330
Número de subunidades	8	8	8	2	1	6	8
Ponto isoelétrico	4.3	5.3	3.5	-	-	-	5.8
pH ótimo	11.3	10.5	10.4	10.8	10	11	12
Km aparente (L-phe)	0.22	0.096	0.088	3.8	0.75	0.22	0.10

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

O atual projeto de pesquisa pretende compreender as principais propriedades físico-químicas e espectroscópicas na formação de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett constituídos pela enzima fenilalanina desidrogenase (PDH), pura e na presença do surfactante ácido esteárico visando a construção de um biossensor para a detecção da L-fenilalanina.

### 2.2. Objetivos específicos

- Estudar a atividade de superfície da enzima PDH e da formação de sua monocamada sobre diferentes condições de subfase aquosa e interpretar os resultados do ponto de vista termodinâmico, reológico, molecular e morfológico;
- Acompanhar os efeitos de alterações conformacionais da enzima PDH adsorvida através de espectroscopia no infravermelho e por dicroísmo circular;
- Investigar como a inserção de uma matriz lipídica (ácido esteárico) interfere na atividade superficial da enzima, bem como sua conformação molecular;
- Avaliar a transferência dos filmes de Langmuir da enzima (pura ou mista com ácido esteárico) pela técnica de Langmuir-Blodgett (LB);
- Caracterizar os filmes LB por técnicas nanogravimétricas, espectroscópicas e morfológicas;
- Verificar, como prova de conceito, a aplicação dos filmes imobilizados em suportes sólidos para o sensoriamento do aminoácido L-fenilalanina.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Reagentes e soluções

A enzima nativa fenilalanina desidrogenase (extraída da *Sporosarcina Ureae*) foi adquirida em sua forma liofilizada (6 unidades/mg, Sigma-Aldrich) e preparada por diluição em água ultrapura (sistema milli-Q, resistividade 18,2 MΩ cm e pH 6,0±0,5) para uma concentração final de 0,90 μM, determinada via espectroscopia no Ultravioleta (280 nm) através da equação 10, com  $\epsilon_{1\%} = 10.12$  (ASANO; NAKAZAWA; ENDO, 1987).

$$C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{A_{280 \text{ nm}}}{\epsilon_{1\%}} 10 \quad (10)$$

Soluções do surfactante ácido esteárico (HSt, Sigma-Aldrich) foram preparadas em clorofórmio (Synth) para uma concentração final de 0,5 mg/mL. Testes de cinética enzimática foram efetuados em meio de tampão glicina/KCl/KOH 100 mM (pH 10,4). Os substratos da reação L-fenilalanina (L-phe) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich) e diluídos em água ultrapura para a produção de soluções estoque com concentrações finais de 120 mM e 30 mM, respectivamente.

### **3.2.Procedimentos experimentais e instrumentação**

- Monocamadas da enzima PDH

Estudos da físico-química de superfície da monocamada de PDH foram realizados em uma sala limpa (Universidade de Miami – Miami, FL) com uma cuba de Langmuir modelo kibron  $\mu$ -trough (Kibron *Inc.*, Helsinki, Finlândia - área de superfície de 124,5 cm<sup>2</sup>) e temperatura média de 25±1°C, a partir do espalhamento uniforme de 30  $\mu$ L da enzima alguns milímetros abaixo de uma interface em subfase de cloreto de sódio 100 mM com uma seringa de 100  $\mu$ L (Hamilton Co., Reno, Nevada). Decorridos 20 minutos do processo de espalhamento as monocamadas eram comprimidas por barreiras móveis a uma taxa constante de 10 mm/min. Os experimentos nos quais a pressão de superfície foi mantida constante ao longo do tempo utilizaram uma taxa de controle programada para as barreiras de 1 mm/min.

- Monocamadas híbridas da enzima PDH com HSt

Os estudos da físico-química de superfície de monocamadas híbridas de PDH e HSt, por sua vez, foram realizadas em uma sala limpa (Universidade Federal de São Paulo – Diadema, SP) utilizando uma cuba de Langmuir modelo mini-KSV (KSV *Instruments*, Helsinki, Finlândia - área de superfície de 124,5 cm<sup>2</sup>) e temperatura média de 25±1°C. Filmes do surfactante foram inicialmente espalhados em subfase de cloreto de sódio 100 mM a partir de um volume de 30  $\mu$ L de uma solução 0,5 mg/mL. Decorridos 10 minutos da evaporação do solvente, um volume de 10  $\mu$ L da dispersão de enzima em água ultrapura era inserido de maneira uniforme na região de interface alguns milímetros abaixo da monocamada de HSt e um tempo de adsorção de 20 minutos era contabilizado antes de qualquer medição. As monocamadas produzidas eram comprimidas por barreiras móveis a uma taxa constante de 10 mm/min. Os experimentos nos quais a pressão de superfície foi mantida constante ao longo do tempo utilizaram uma taxa de controle programada para as barreiras de 1 mm/min.

- Produção de filmes Langmuir-Blodgett

A deposição de filmes LB na superfície de diferentes suportes sólidos (quartzo e mica) foi efetuada com o auxílio de um dispositivo mecânico acoplado à cuba de Langmuir, permitindo a imersão dos

substratos na subfase aquosa, bem como sua retirada, com velocidade constante de 1 mm/min. A superfície dos suportes utilizados para deposição era previamente limpa em solução etanólica de KOH 5% (m/v) por sonicação durante 10 minutos, com posterior lavagem em água ultrapura.

### 3.3.Principais técnicas de caracterização

- Filmes de Langmuir

**UV-Vis *in situ*** - Medidas da absorção da monocamada de PDH foram obtidas por espectroscopia no UV-vis utilizando um espectrofotômetro 8452A HP acoplado uma cuba KSV mini-trough (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlândia - área de superfície de 225 cm<sup>2</sup> - Universidade de Miami – Miami, FL) por meio de um suporte fixo montado em um trilho.

**Fluorescência *in situ*** - Espectros de emissão por fluorescência foram medidos a 1 mm da interface com uma fibra óptica de área 0,25 cm<sup>2</sup> acoplada a um espectrofotômetro Spex Fluorolog (Horiba, Jovin Yvon, Edison, NJ - Universidade de Miami – Miami, FL).

**Testes de reologia pelo método das barreiras oscilatórias** – Monocamadas da enzima PDH foram submetidas a sucessivos processos de compressão e descompressão de forma oscilatória, a uma frequência aplicada de 20 mHz das barreiras e a área da cuba sofrendo uma variação máxima de 1%.

**PM-IRRAS monocamadas PDH** - Um espectrofotômetro Bruker Equinox 55 FT-IR (Billerica, MA - Universidade de Miami – Miami, FL) adaptado para análises em interface (Figura A2) foi utilizado para coletar espectros da monocamada de PDH no modo refletância com um ângulo de incidência da luz polarizada de 80°. Os parâmetros para obtenção dos espectros foram: resolução espectral de 8 cm<sup>-1</sup> e tempo de aquisição de 20 minutos.

**PM-IRRAS monocamadas híbridas (HSt/PDH)** - Um espectrofotômetro KSV PMI 550 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlândia - Universidade Federal de São Paulo – Diadema, SP) foi utilizado na obtenção dos espectros da monocamada híbrida utilizando o modo refletância, com um ângulo de incidência da luz polarizada de 80°. Os parâmetros para obtenção dos espectros foram: resolução espectral de 8 cm<sup>-1</sup> e tempo de aquisição de 20 minutos.

**Microscopia BAM** - Imagens dos filmes formados na interface ar/subfase foram obtidas com o uso de um microscópio no ângulo de Brewster (BAM) modelo MicroBAM (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlândia - Universidade Federal de São Paulo – Diadema, SP).

- Filmes Langmuir-Blodgett

**Dicroísmo circular** - Espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos para a enzima PDH diluída em água (20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e para o filme Langmuir-Blodgett de uma única camada transferida para a superfície de um substrato de quartzo (área depositada de 3,2  $\text{cm}^2$ ) com um espectropolarímetro (JASCO J-810 - Universidade de Miami – Miami, FL).

**Microscopias de força atômica** - Um microscópio da marca Agilent Technologies modelo 5420 (Universidade de Miami – Miami, FL) foi utilizado para obtenção de imagens de microscopia de força atômica (AFM) de filmes depositados sobre suportes de mica (área depositada de 7,5  $\text{cm}^2$ ). Os parâmetros de operação na captura de imagens foram: frequência de ressonância de 110 kHz e taxa de varredura de 1,0 Hz para uma área de amostragem de 10 x 10  $\mu\text{m}$ . Todos os filmes transferidos foram lavados com água deionizada e secos antes das medições de AFM.

**Microbalança de quartzo** – Estimativas da densidade de massa dos filmes transferidos foram obtidas em uma microbalança (QCM, Stanford Research Systems Inc. - Universidade Federal de São Paulo – Diadema, SP) utilizando um disco de quartzo recoberto com ouro (frequência fundamenta de 5 MHz) como suporte para deposição.

**Espectroscopia de emissão por fluorescência** - Espectros de emissão dos filmes LB híbridos foram medidos com um espectrofotômetro Spex Fluorolog (Horiba, Jovin Yvon, Edison, NJ - Universidade de Miami – Miami, FL).

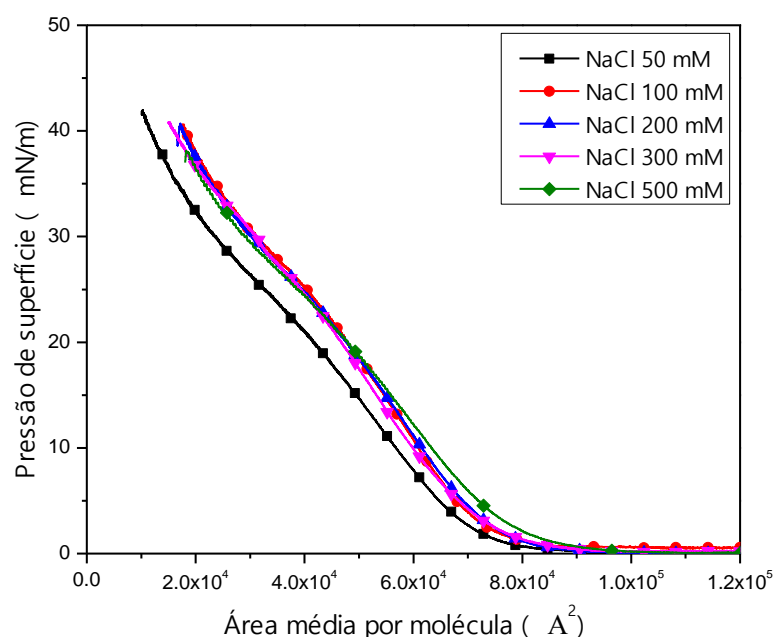
### **Cinética enzimática**

A capacidade do filme de PDH em detectar a L-fenilalanina foi testada frente a uma concentração fixa de 2,5 mM do aminoácido e do cofator enzimático  $\text{NAD}^+$  em tampão glicina/KCl/KOH 100 mM (pH 10,4) por meio da técnica de espectroscopia no UV-vis (Agilent scientific, modelo Cary60 - Universidade Federal de São Paulo – Diadema, SP) para um volume de mistura de reação final de 3 mL. Os filmes LB da enzima co-imobilizada com o surfactante ácido esteárico foram depositados dentro da cubeta de reação (quartzo) na presença dos substratos e após intervalos regulares de 10 a 20 min de reação os filmes LB eram retirados da mistura de reação, e os espectros eram medidos seguindo o acréscimo do sinal de absorbância em 340 nm devido à redução do cofator  $\text{NAD}^+$  a NADH ao longo da reação (reação B da Figura 10) (WALKER, 1992).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Comportamento da enzima PDH adsorvida na interface ar-água

Estudos iniciais do comportamento de interface da enzima foram realizados espalhando-se 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de concentração 0,90  $\mu\text{M}$  de PDH em subfase de água ultrapura. Apesar de apresentar atividade de superfície (apresenta excesso superficial), o perfil de compressão da enzima em água não apresentou área molecular média e pressão máxima reprodutíveis, conforme apresentado na Figura A1 (sessão de apêndices). Tal fato está atrelado à elevada solubilidade da enzima em água, produzindo uma monocamada de Gibbs e com processos dinâmicos de adsorção e dessorção entre a interface e a subfase aquosa predominantes durante o processo de compressão superficial. A utilização de sais em subfase é uma técnica amplamente utilizada para elevar a adsorção de enzimas na interface através do efeito de relargagem (*salting-out*) (DZIRI; PUPPALA; LEBLANC, 1997). A Figura 11 apresenta diferentes isotermas de pressão de superfície-área obtidas para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio com diferentes concentrações.

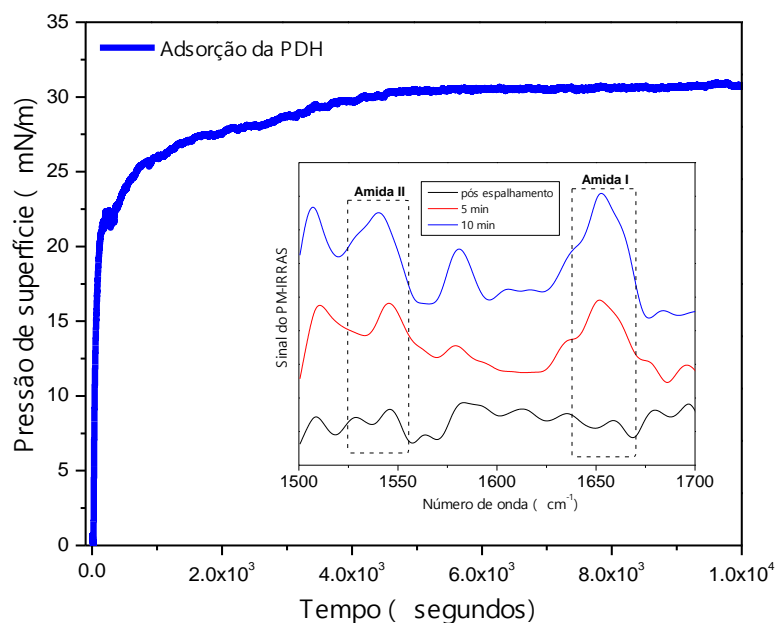


**Figura 11** – Isotermas pressão de superfície-área para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio com diferentes concentrações.

É possível verificar que o acréscimo no número de moléculas de enzima presentes na região de interface levou à formação de filmes mais expandidos quando em comparação com os resultados obtidos em subfase de água ultrapura (Figura A1). Tal expansão pode não estar somente relacionada a processos de acomodamento molecular intrínsecos, mas principalmente devido ao fato que para a subfase de água pura, o número de moléculas da interface calculado provavelmente deve estar defasado devido à solubilização de um fração das moléculas de PDH na subfase aquosa.

Outro fato importante a se mencionar está relacionado à melhora na reprodutibilidade da pressão máxima de colapso, bem como uma menor variação na área molecular média ocupada pelo filme na interface, que passou a ocorrer dentro de um intervalo mais restrito, de  $4,8 \times 10^4$  a  $5,2 \times 10^4$  Å<sup>2</sup> (Figura A2). Como concentrações de sal superiores a 100 mM não produziram variações significativas na área molecular média dos filmes de PDH, esta concentração foi adotada como concentração padrão para a execução de experimentos posteriores levando-se em consideração que elevadas concentrações de sal poderiam causar a perda de atividade enzimática ou até mesmo a desnaturação total da enzima.

A cinética de adsorção da enzima em interface ar/NaCl<sub>(aq)</sub> foi testada inserindo-se 30 µL da solução 0,90 µM de PDH alguns milímetros abaixo da superfície da subfase, com uma área constante em 30 cm<sup>2</sup>. A Figura 12 apresenta a variação da pressão de superfície como função do tempo. É possível observar que a maior adsorção ocorreu nos primeiros 20 minutos experimentais, quando 86,7% da pressão máxima de superfície foi atingida, a 26 mN/m. Durante os 50 minutos seguintes a pressão de superfície variou mais 4 mN/m, atingindo o valor final máximo de 30 mN/m. O processo de adsorção também pôde ser acompanhado via espectroscopia no infravermelho por refletância (IRRAS), conforme apresentado no espectro em anexo na Figura 12. As bandas Amida I ( $1650 \text{ cm}^{-1}$ ) e Amida II ( $1540 \text{ cm}^{-1}$ ) são atribuídas às vibrações de estiramento C=O e à deformação angular da ligação N-H presentes no esqueleto peptídico de todas as enzimas (BLAUDEZ et al., 1992; BLAUDEZ; CASTANO; DESBAT, 2011). Foi observada a direta proporcionalidade na intensidade relativa do sinal destas bandas com o tempo de adsorção enzimática.



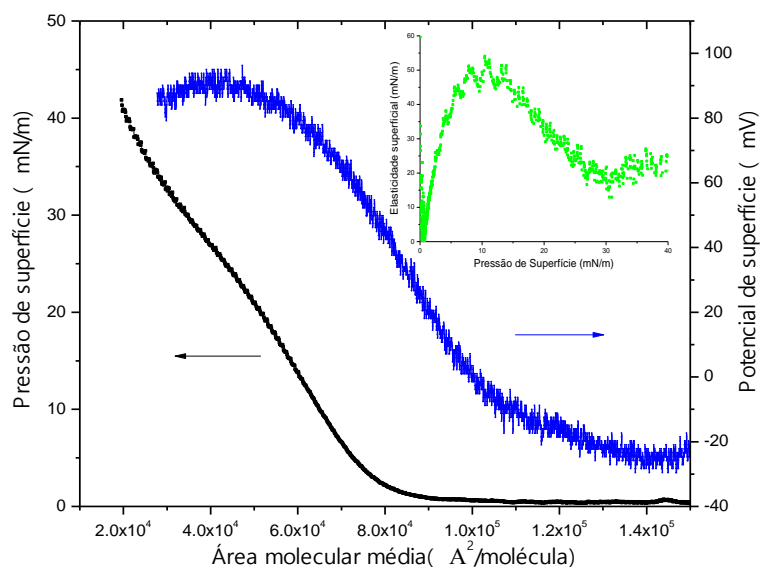
**Figura 12** – Cinética de adsorção da enzima PDH em subfase de NaCl 100 mM. O gráfico em anexo apresenta o acompanhamento da adsorção via espectroscopia no infravermelho para a região de 1500 a 1700 cm<sup>-1</sup>.



A Figura 13 apresenta as curvas de potencial e pressão de superfície obtidas em função da área molecular média ocupada pelo filme de PDH ao longo de sua compressão. Para áreas superiores a  $9 \times 10^4$  Å<sup>2</sup>/molécula, o sistema apresentou pressão de superfície nula, o que indica a fase gasosa da monocamada enzimática, onde as interações laterais entre moléculas vizinhas de PDH podem ser consideradas desprezíveis. À medida que a área disponível por molécula foi diminuída, pela compressão do filme, um aumento progressivo da pressão superficial também foi observado, o que significa que as moléculas de enzima começaram a interagir progressivamente, e novas fases bidimensionais tornaram-se acessíveis. O sistema atingiu a pressão máxima de 40 mNm<sup>-1</sup>, com uma área de seção transversal mínima estimada em  $86,5 \times 10^3$  Å<sup>2</sup>/molécula.

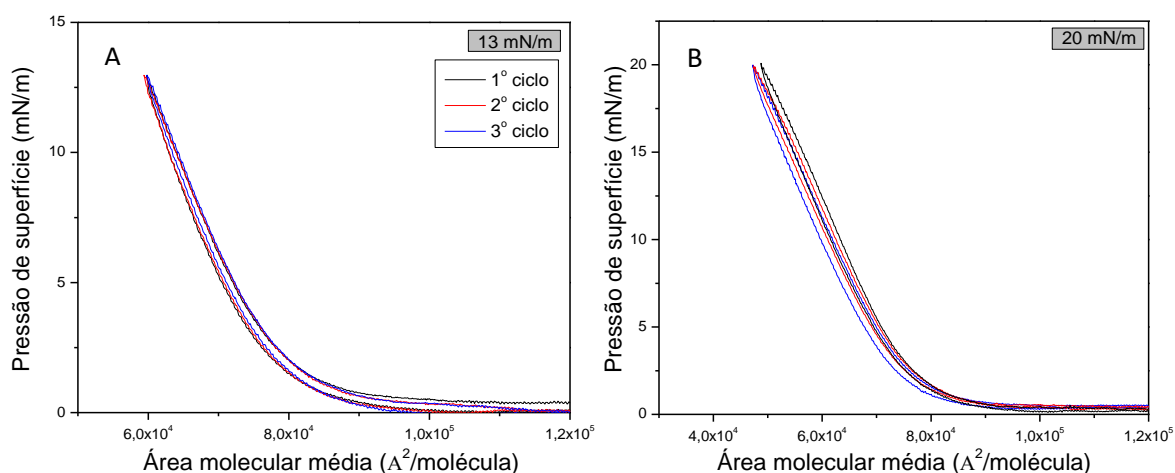
O potencial de superfície por sua vez, apresentou valor inicial negativo de 24 mV para o filme em seu estado gasoso, o que está relacionado à presença da camada de Gouy-Chapman prontamente formada pela adsorção de íons Na<sup>+</sup>, provenientes da solução, às moléculas de PDH adsorvidas na interface (DAVIES, 1951). À medida que a área disponível para o filme foi reduzida, os momentos de dipolo associados aos peptídeos da estrutura primária das cadeias da PDH começam a se alinhar na superfície, superando a contribuição negativa dos íons em solução, e produzindo um aumento geral do potencial na região de interface até um valor máximo de 88 mV para o filme em seu maior estado de compactação. Assim como observado para as isotermas pressão de superfície-área, as curvas de potencial de superfície da monocamada de PDH apresentaram satisfatória reprodutibilidade em subfase de NaCl (Figura A4).

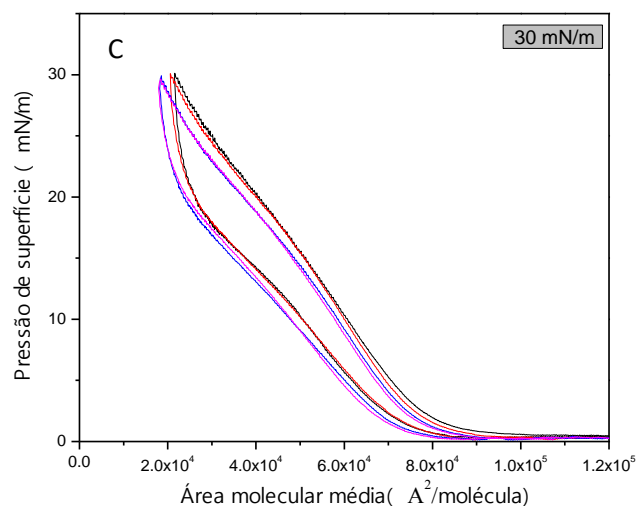
O fator de compressibilidade do filme foi derivado de sua isoterma a partir da equação 7 e plotado em função da pressão de superfície, conforme representado em anexo à Figura 13. É possível observar que a enzima produz um filme altamente fluido, permanecendo predominantemente em seu estado líquido-expandido ao longo de quase todo o processo de compressão. Tal fato está de acordo com os valores esperados de fator de compressibilidade para macromoléculas visto que estes compostos estão sujeitos a processos de rearranjo conformacional ao longo de sua compressão (MATÉ et al., 2014; VÁZQUEZ et al., 2017).



**Figura 13** - Isotherma potencial de superfície-área (curva em azul) e pressão de superfície-área (curva em preto) para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio 100 mM.

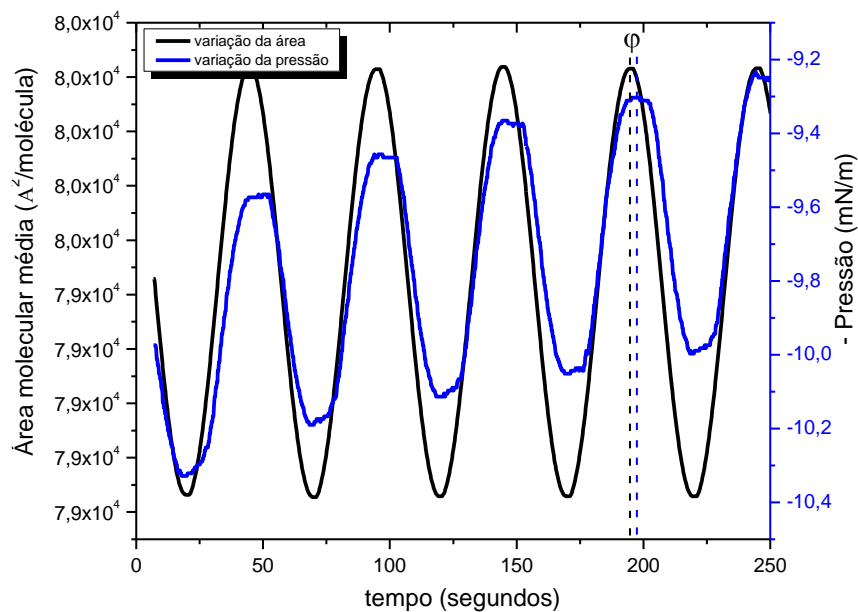
O filme interfacial de PDH teve sua reversibilidade avaliada frente a diferentes ciclos de compressão e descompressão, conforme apresentado nas Figuras 14A-14C. Verifica-se que nos casos em que o ciclo de compressão máxima ocorreu entre pressões de superfície baixas (Figura 14A) e intermediárias (Figura 14B) o filme apresentou bom comportamento elástico, o que indica que nesses casos a compressão do filme produz deformações reversíveis. Por outro lado, nos casos em que o ciclo de compressão máxima ocorreu em pressões de superfície superiores a 30 mN/m (Figura 14C, por exemplo) foi verificada significativa perda do comportamento elástico do filme, evidenciado pela formação de histereses entre todos os ciclos.





**Figura 14** – Ciclos de compressão e descompressão para o filme de PDH em subfase de NaCl 100 mM em pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C).

A partir das tendências observadas nos ciclos de compressão e descompressão, as contribuições elástica e viscosa do filme foram avaliadas separadamente, em regime dinâmico, utilizando o método das barreiras oscilantes. Aqui, estímulos oscilatórios de baixa frequência foram aplicados ao filme através das barreiras laterais da cuba, e as respostas produzidas pelo sistema (também oscilatórias e de mesma frequência) foram acompanhadas como variação na pressão de superfície, conforme exemplificado abaixo na Figura 15.



**Figura 15** – Ciclos de oscilação para a monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM para a pressão de superfície de 10 mN/m.

As amplitudes de oscilação permitem o cálculo das variações de área ( $\Delta A$ ) e de pressão ( $\Delta P$ ) do filme, e de modo similar ao efetuado previamente para o cálculo da compressibilidade em regime estático, podemos estimar o módulo de elasticidade complexo do filme ( $E^*$ ) através da equação 11:

$$E^* = A_{média} \left( \frac{\Delta P}{\Delta A} \right)_T \quad (11)$$

Conforme apresentado na equação 8, o módulo de elasticidade complexo pode ser entendido como a soma das contribuições puramente elásticas ( $E'$ ) e puramente viscosas ( $E''$ ) do sistema. A tabela 3 apresenta os valores calculados para as contribuições elástica e viscosa do filme de enzima, bem como o desvio de fase presente entre as oscilações do estímulo e da resposta.

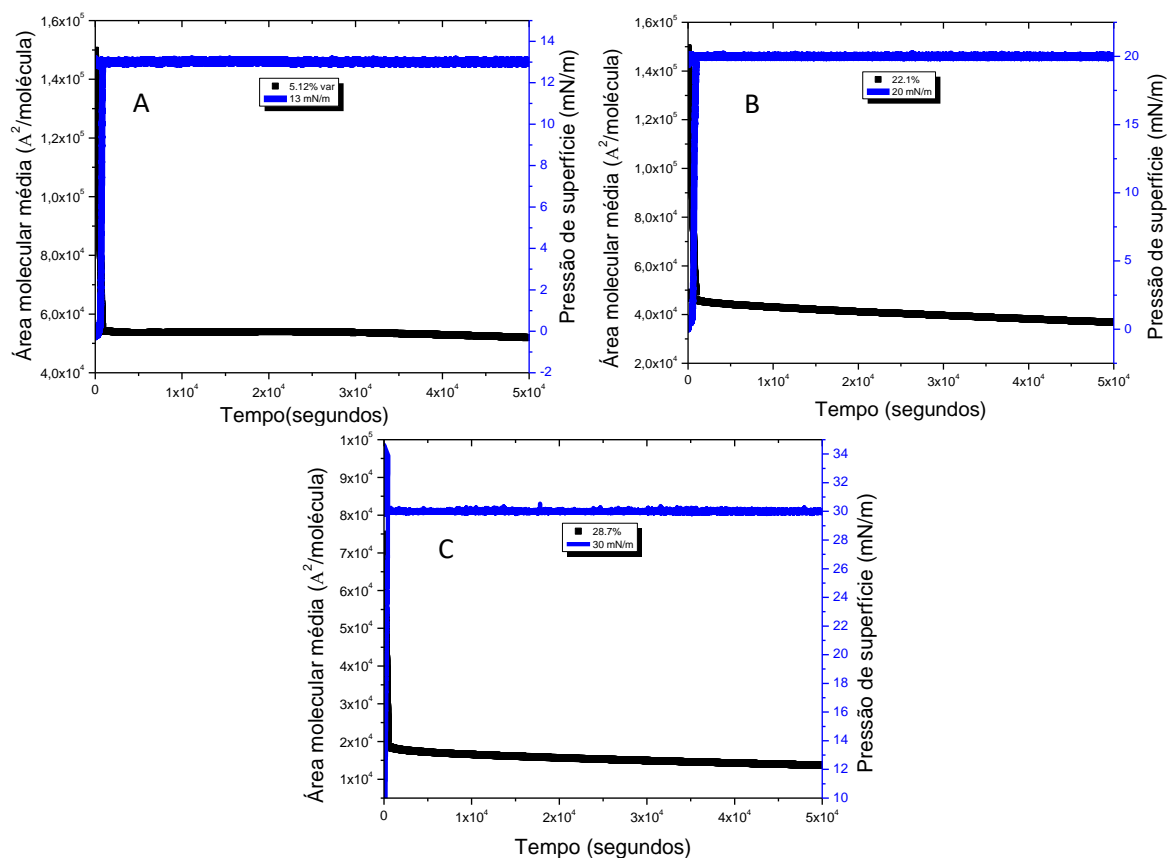
**Tabela 3** – Parâmetros reológicos calculados para a monocamada de PDH em diferentes pressões de superfície.

Pressão (mN/m)	10	20	30
Fase (radianos)	0.37	0.35	0.51
Componente elástica (mN/m)	33.0	34.7	48.6
Componente viscosa (mN/m)	12.8	12.6	26.9
Viscosidade dilatacional (mN.s/m)	16.2	15.9	34.1

De um modo quantitativo, os dados apresentados na tabela 3 concordam com as observações dos ciclos de compressão e descompressão, apresentados anteriormente. Verifica-se que enquanto a componente elástica do filme sofre um acréscimo de 5,15% e 40,05% entre as pressões de 10 e 20 mN/m e 20 e 30 mN/m, respectivamente, a componente viscosa praticamente não sofre alteração entre as pressões de 10 e 20 mN/m mas tem seu valor aumentado em 113,5% ao passar das pressões de 20 para 30 mN/m. A mesma tendência pôde também ser observada no atraso de fase entre as respostas de variação de área e pressão e para os valores de coeficiente de viscosidade dilatacional ( $\eta$ ), calculados através da equação 12, com  $f$  representando a frequência de oscilação da barreira em radianos/segundo:

$$E'' = 2\pi f \eta \quad (12)$$

O filme enzimático também foi avaliado sob o ponto de vista de sua estabilidade pelo monitoramento na variação média de sua área molecular ao longo de 15 horas experimentais para diferentes pressões de superfície, conforme apresentado na Figura 16. Para a pressão inicial de 13 mN/m (Figura 16A), foi verificada uma variação na área molecular do filme de 5,1%, enquanto que as pressões de 20 e 30 mN/m (Figuras 16B e C) apresentaram variações de 22,1% e 28,7%, respectivamente, o que indicou uma diminuição na estabilidade do filme com o aumento da pressão máxima do sistema, o que pode estar relacionado principalmente à alterações conformacionais relacionadas à acomodação da enzima na interface ou à dissolução perda de moléculas para a subfase.



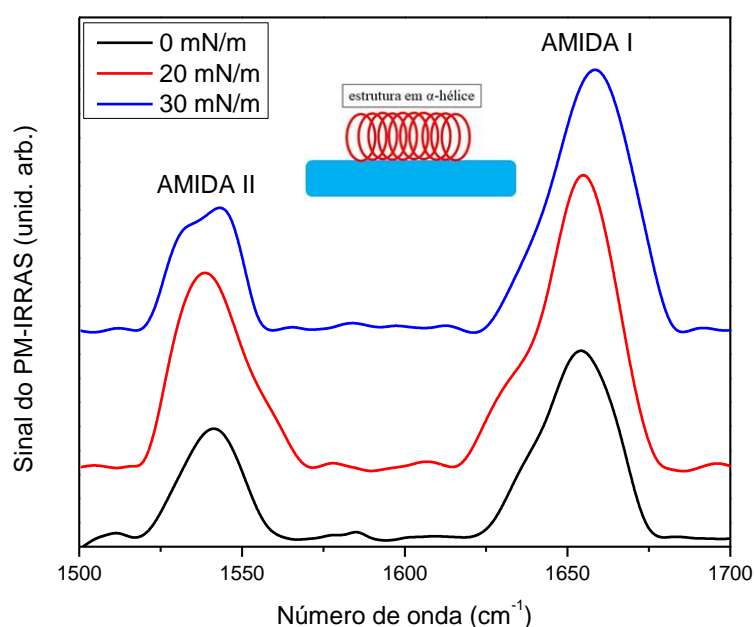
**Figura 16** – Perfis de estabilidade da monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM para pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C).

A técnica de infravermelho por refletância com modulação da luz polarizada (PM-IRRAS) é sensível à orientação das principais estruturas secundárias de biomoléculas adsorvidas em interfaces, como as estruturas  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha amplamente encontradas em proteínas e enzimas. A tabela 4 apresenta um resumo das principais relações existentes entre os grupos amida (I e II) e a região do espectro atribuída às estruturas tipo de estrutura secundária.

**Tabela 4-** Atribuição de bandas observadas na região de 1500 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  do infravermelho. Adaptado de (BLAUDEZ et al., 1992; MENDELSON; BRAUNER; GERCKE, 1995).

Grupo químico	Tipo de estrutura secundária	Região do espectro de infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ )
AMIDA I (estiramento C=O)	$\alpha$ -hélice	1650 a 1660
	$\beta$ -folha	1620 a 1630
AMIDA II (flexão N-H acoplada com estiramento C-N)	$\alpha$ -hélice	1540 a 1550
	$\beta$ -folha	1520 a 1535

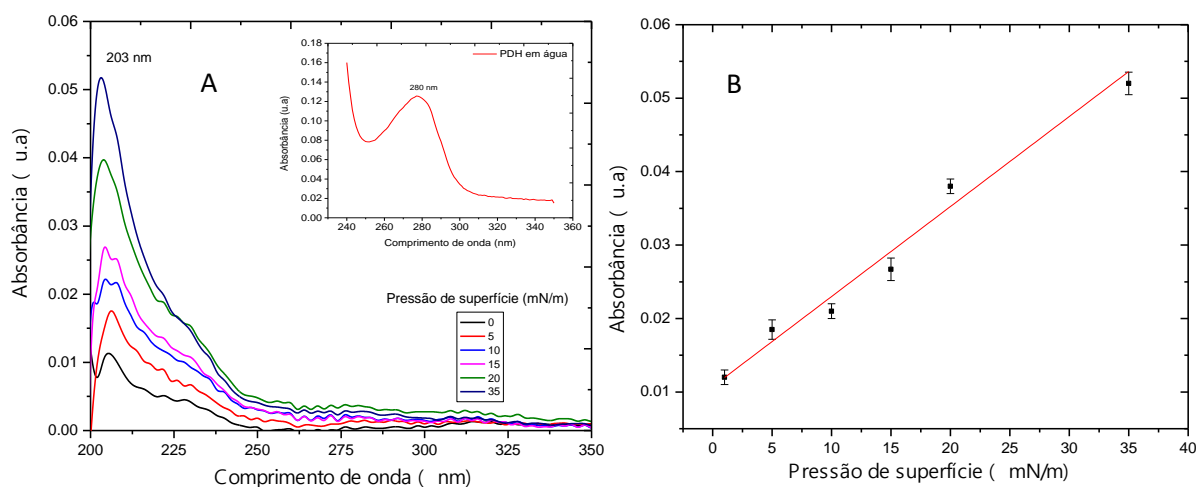
A Figura 17 apresenta os espectros de PM-IRRAS obtidos para a monocamada da enzima em diferentes pressões de superfície. Como é possível observar, a presença de bandas amida bem definidas e com máximos nas regiões de 1654 e 1540  $\text{cm}^{-1}$  indicou a formação majoritária de estruturas do tipo  $\alpha$ -hélice na interface. Além disso, os ombros na faixa de 1630  $\text{cm}^{-1}$ , para as pressões de 0 e 20 mN/m, e em 1530  $\text{cm}^{-1}$  para a pressão superior de 30 mN/m, indicaram a existência de estruturas do tipo  $\beta$ -folha, porém em menor extensão. Uma vez que os espectros apresentaram bandas de intensidade positiva em relação a linha de base, pode-se concluir que os grupos C=O e N-H apresentam orientação preferencialmente paralela na interface ao longo de todo processo de compressão do filme, conforme representado na imagem em anexo da Figura 17 (BLAUDEZ; CASTANO; DESBAT, 2011).



**Figura 17** – Espectros de PM-IRRAS para a monocamada de PDH adsorvida em subfase de NaCl 100 mM em diferentes pressões de superfície.

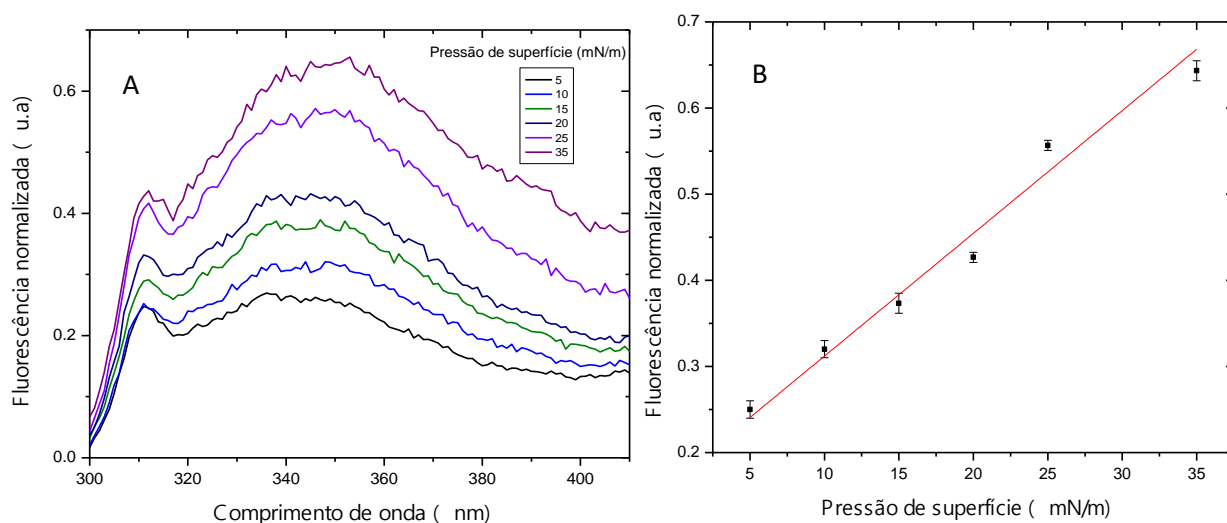
A Figura 18A apresenta o espectro de absorção no UV-vis da monocamada de PDH realizado *in situ* ao longo de sua compressão. A forte banda de absorção observada em 203 nm está relacionada à transição  $n-\pi^*$  das carbonilas de amida presentes nas ligações peptídicas da estrutura primária da enzima. Observa-se na Figura 18B, que a compressão da enzima produziu um acréscimo linear do sinal de absorção da monocamada, o que fornece evidências de que sua densidade de superfície também aumentou de modo linear com a pressão de superfície. O espectro anexo na Figura 18A foi obtido para a enzima em meio aquoso. Como é possível observar, a enzima absorveu radiação no comprimento de onda de 280 nm, que está relacionada ao único grupo triptofano presente na 375ª posição da estrutura primária da PDH (BRUNHUBER et al., 1994). A ausência desta banda no espectro de absorção da enzima na forma de monocamada pode ser explicada pelo fato de que a densidade superficial do aminoácido é muito baixa para

ser detectada. Resultados similares foram também reportados para outros filmes de enzima adsorvidos (CAO et al., 2002).



**Figura 18** – Espectro de absorção por UV-vis da monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM (A) e a correlação entre o sinal de absorbância e a pressão de superfície do filme (B).

Embora nenhuma banda de absorção para os resíduos de triptofano tenha sido registrada através da técnica de absorção no UV-vis, curiosamente, a emissão dos aminoácidos presentes na monocamada pôde ser detectada em 350 nm quando o filme foi excitado no comprimento de onda de 280 nm, de acordo com a Figura 19A. Assim como observado anteriormente para a absorção do filme, o sinal de fluorescência também aumentou linearmente com a pressão de superfície (Figura 19B). O que reforça o aumento linear da concentração de superfície do filme ao longo de sua compressão. Apesar do baixo número de resíduos de triptofano apresentados pelo filme, o alto rendimento quântico de fluorescência do aminoácido pareceu desempenhar um papel importante em sua detecção interfacial.



**Figura 19** - Espectro de emissão por fluorescência da monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM (A) e a correlação entre o sinal de absorbância e a pressão de superfície do filme (B).

O estudo da morfologia apresentada pela monocamada de PDH ao longo de sua compressão foi realizado por meio da técnica de microscopia no ângulo de Brewster, conforme apresentado na Figura 20. É possível verificar que tanto em sua fase gasosa (Figura 20A) quanto em sua fase líquido-expandida (Figura 20D) o filme apresentou aspecto homogêneo, evidenciado pela ausência de contraste em ambas microscopias. As Figuras 20B e 20C, por sua vez, foram obtidas na região de “decolagem” da curva de compressão isotérmica da PDH, quando sua pressão de superfície começa a aumentar (entre 0,5 e 1 mN/m). Neste breve intervalo, o contraste observado nas microscopias permitiu identificar a segregação entre as fases gasosa e líquido-expandida do filme com a formação de domínios de tamanho e morfologia irregulares.



**Figura 20** – Microscopias no ângulo de Brewster para a monocamada de PDH em NaCl 100 mM antes da transição de fase para seu estado líquido-expandido (A), no início e ao longo da transição (B e C, respectivamente) e após a transição (D). Resolução de 3600 x 4000  $\mu\text{m}$ .

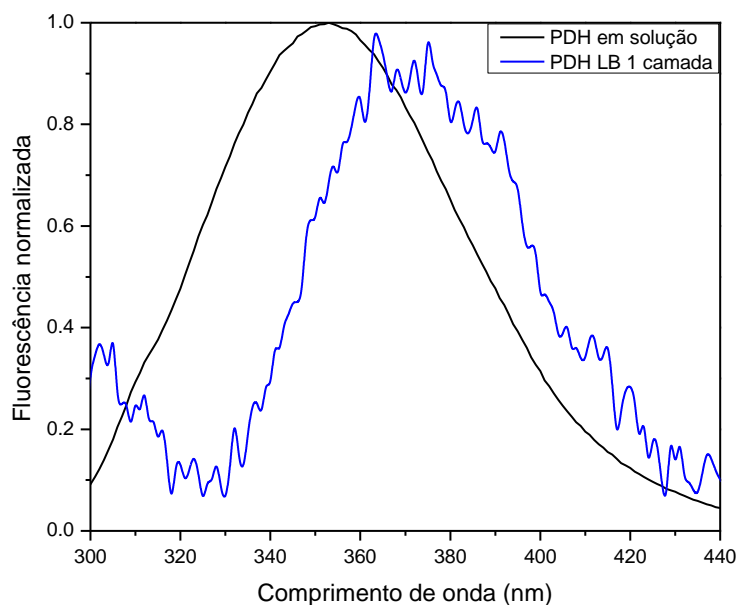


A deposição de filmes em suportes sólidos pode ser avaliada pelo cálculo da taxa de transferência (TR), que é definida como a razão entre a diminuição na área do filme de superfície durante sua deposição e a área do suporte sólido. Uma deposição ideal tem um TR igual a 1, significando que toda a superfície do suporte foi recoberta pelo filme depositado. A Tabela 5 apresenta os valores calculados de taxa de transferência do filme de PDH para a superfície de uma placa de quartzo em diferentes estágios de sua compactação na interface. As melhores taxas de transferência foram obtidas quando deposições foram efetuadas em pressões de superfície mais altas, que por sua vez está relacionado a maior densidade de superfície do filme, conforme previamente indicado pelas análises de absorção e emissão *in situ*. Tentativas de deposição em multicamadas resultaram em taxas de transferência nulas. Assim, posteriores caracterizações do filme foram efetuadas para uma única camada depositada na pressão de superfície de 35 mN/m.

**Tabela 5** – Valores calculados para a deposição de uma única camada do filme LB da enzima PDH em suportes sólidos de quartzo.

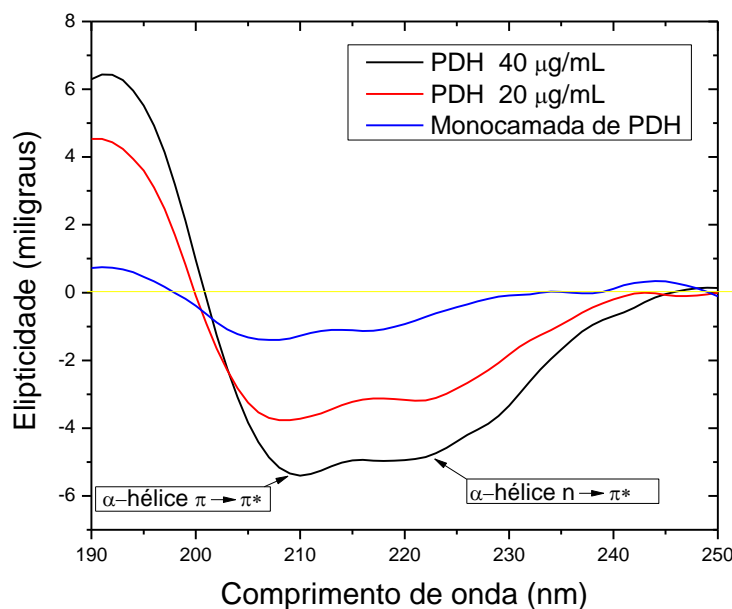
Taxa de transferência	Pressão de deposição (mN/m)
0.52	15
0.68	25
0.89	35

A Figura 21 apresenta a comparação dos espectros de emissão por fluorescência da enzima PDH em solução e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo. Em ambos os casos a amostra foi excitada no comprimento de onda de 280 nm. Apesar do fraco sinal proveniente da monocamada foi possível observar que a imobilização da enzima resultou no deslocamento da emissão de seus grupos triptofano para maiores comprimentos de onda (350 nm para 370 nm). Deslocamentos para o vermelho estão relacionado com a diminuição da diferença de energia entre os estados HOMO e LUMO no estado sólido por meio do maior número de interações entre cadeias, o que indica maior grau de agregação da PDH quando depositada na forma de monocamada (FERREIRA et al., 2007; HU et al., 1991).



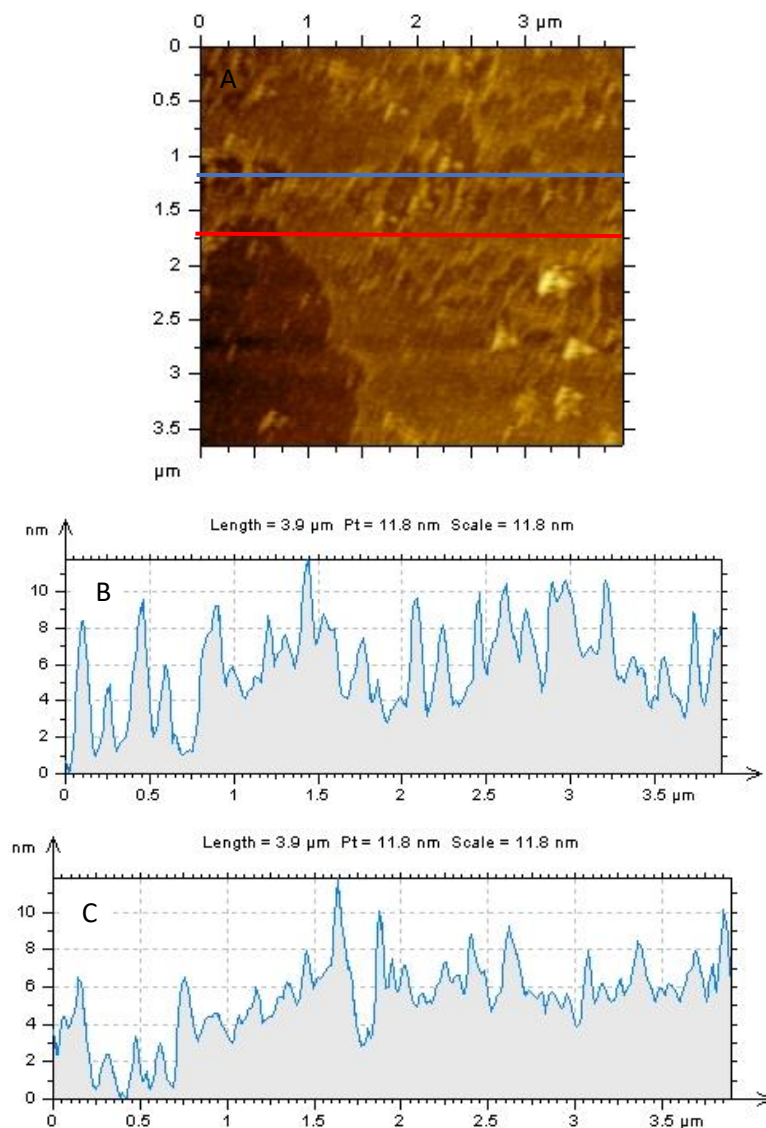
**Figura 21** - Espectros de emissão por fluorescência da enzima PDH em solução (curva em preto) e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo (curva em azul).

A espectroscopia de dicroísmo circular tem como princípio a medida da absorbância diferencial entre as duas rotações de luz circularmente polarizada (direita ou esquerda) por amostras que contenham moléculas assimétricas. A luz transmitida deixa a amostra com forma elipsoidal, que pode ter seu desvio em miligraus determinado, dando origem aos espectros de elipticidade *versus* comprimento de onda. Informações importantes a respeito da estrutura secundária de proteínas e enzimas podem ser obtidas estudando-se a região do UV distante (abaixo de 260 nm) (SILIGARDI et al., 2014). Conforme apresentado na Figura 22, as principais bandas de transição relacionadas as estruturas em  $\alpha$ -hélice da enzima podem ser observadas tanto nos espectros de soluções diluídas da enzima (20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) quanto no espectro da monocamada sobre a superfície do suporte sólido, o que indica a manutenção das principais estruturas secundárias da enzima após os processos de espalhamento na interface ar/ $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$  e sua posterior imobilização. A discreta mudança no comprimento de onda para os espectros em solução e aquele obtido para o filme transferido está relacionada à dispersão da luz devido a mudança no índice de refração da luz ao passar do ar para a lâmina.



**Figura 22** - Espectros de dicroísmo circular da enzima PDH em solução (curvas em preto e vermelho) e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo (curva em azul).

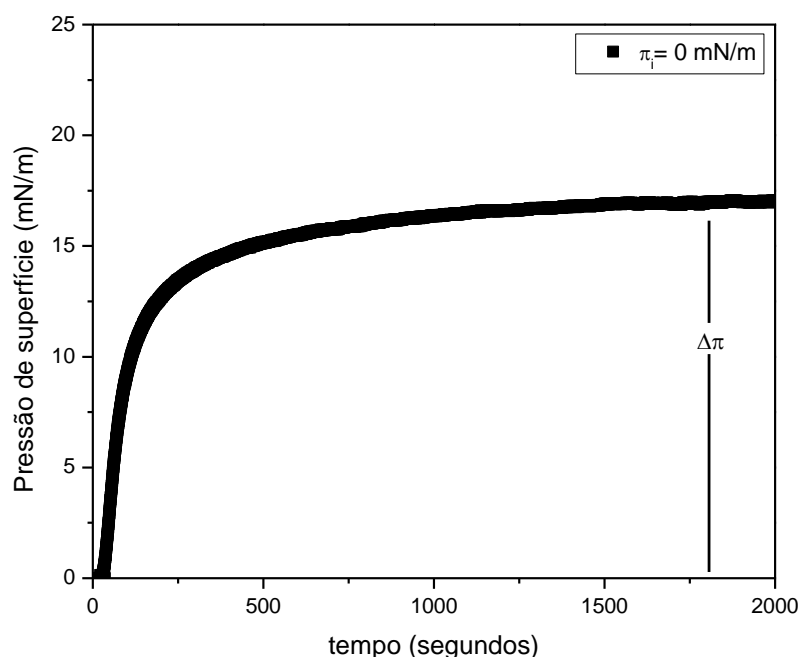
Além de suas características espectroscópicas a monocamada de PDH teve sua morfologia avaliada por meio da técnica de microscopia de força atômica, conforme apresentado na Figura 23 para um recorte de  $12,25 \mu\text{m}^2$  de área de um suporte de mica contendo o filme da enzima depositado. Estruturas com morfologia plana são facilmente obtidas em suportes de mica pela remoção de camadas superiores, e diferentes compostos depositados sob sua superfície podem ser facilmente identificados pela presença de contraste nas microscopias. Assim, a presença do filme de PDH foi identificada pela presença de regiões mais claras (maior relevo) em relação ao substrato. Como é possível observar, a presença buracos no filme (regiões mais escuras) indicou um recobrimento heterogêneo e irregular do suporte, o que explica os valores de taxa de transferência inferiores a 1 (tabela 4). Os perfis de altura do filme foram obtidos ao longo de dois cortes longitudinais de  $3,5\mu\text{m}$  para duas regiões diferentes do filme (Figuras 23A e B), indicando uma topografia com alta rugosidade e altura na faixa de 8 a 10 nm.



**Figura 23** – Microscopia de força atômica de uma camada de PDH depositada sobre mica (A). Perfis de relevo destacados em azul (B) e vermelho (C).

#### 4.2. Comportamento da enzima PDH incorporada em monocamadas de ácido esteárico

Os primeiros estudos da interação entre a PDH e ácido esteárico na interface basearam-se na adsorção de moléculas da enzima provenientes da subfase em monocamadas previamente formadas do surfactante a partir da avaliação dos parâmetros de ligação entre os dois compostos ( $\Delta\pi$ , pressão de exclusão e fator de sinergia), para isso diferentes pressões de superfície iniciais ( $\pi_i$ ) foram testadas para a monocamada de HSt, gerando curvas de variação da pressão ( $\Delta\pi$ ) em função do tempo de injeção da amostra conforme no gráfico apresentado na figura 24 para a pressão inicial de 0 mN/m da monocamada de HSt. Os demais dados experimentais podem ser encontrados nas figuras A7-A11 da sessão de apêndices.

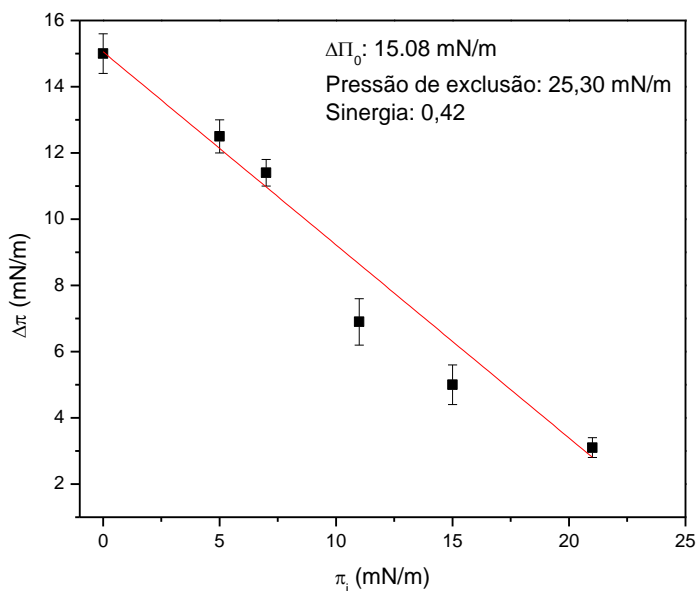


**Figura 24** - Cinética de adsorção da enzima PDH em monocamada de HSt a uma pressão inicial de 0 mN/m e subfase de cloreto de sódio 100 mM.

Os valores de  $\Delta\pi$  podem ser lançados em gráficos em função de  $\pi_i$ , dando origem ao gráfico apresentado na Figura 25. Como observado, o decréscimo de  $\Delta\pi$  apresentou tendência linear com a pressão inicial da monocamada de HSt, o que indica uma menor adsorção da enzima na interface em altas pressões de superfície. O intercepto da curva de tendência linear com o eixo das abscissas representa a pressão a partir da qual as moléculas de enzima não são mais capazes de acessar a região de interface, denominada pressão de exclusão (CALVEZ et al., 2011). Para o sistema PDH/HSt, a pressão de exclusão foi estimada em 25,3 mN/m e um fator de sinergia de 0,42, indicando uma interação positiva entre a proteína e o ácido carboxílico. Os experimentos seguintes foram efetuados adotando-se a pressão inicial de 0 mN/m para a monocamada de HSt como pressão de superfície inicial devido a maior adsorção da PDH.

Os mesmos experimentos foram efetuados também em subfase de água ultrapura para efeito de comparação (Figura A12). É importante mencionar que tanto a pressão máxima de exclusão quanto o intercepto da curva de tendência linear observados para a adsorção em água foram menores (10,05 e 1,95 mN/m, respectivamente), porém, o fator de sinergia da PDH com a monocamada de HSt foi maior (0,80). De acordo com Calvez et al. 2011, a variação de pressão de superfície pode estar relacionada tanto à extensão da inserção do material na monocamada de surfactante quanto à quantidade de material que se liga ou apenas interage com o filme na interface. Assim, o fator de sinergia está diretamente relacionado à ocorrência de interações hidrofóbicas e eletrostáticas em filmes de materiais surfactantes, o que explica a menor sinergia

entre a enzima e o surfactante na presença de sal em subfase quando em comparação à subfase de água ultrapura.

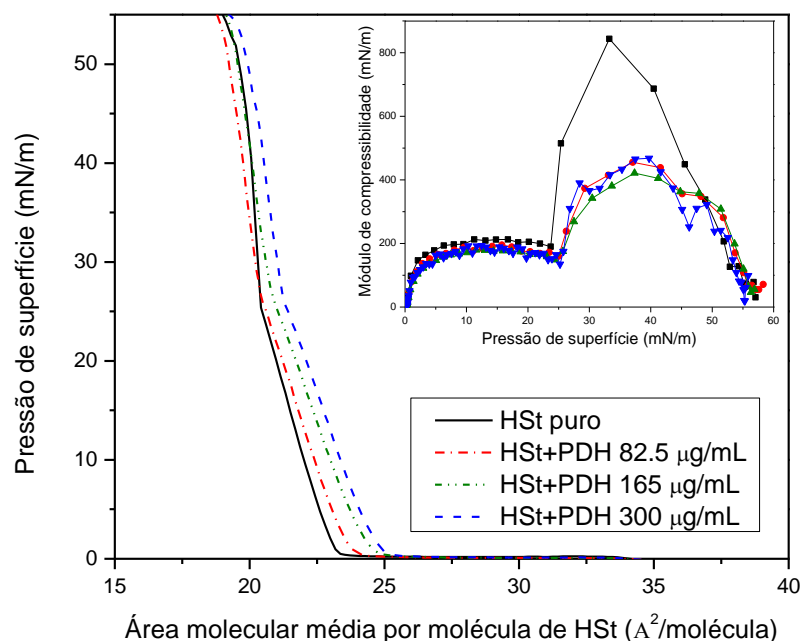


**Figura 25** – Gráfico de variação de pressão de superfície em função da pressão de superfície inicial para a inserção da enzima PDH em monocamadas de HSt em subfase de NaCl 100 mM.

A Figura 26 apresenta a comparação entre as isotermas de pressão de superfície-área da monocamada de HSt puro e na presença de PDH a partir de diferentes concentrações. É possível observar que a incorporação da enzima promoveu a expansão da monocamada de HSt, o que está diretamente relacionado ao aumento das repulsões entre as cadeias laterais do surfactante para acomodar as moléculas de enzima na região da interface. O efeito de expansão da monocamada de HSt também pôde ser observado em subfase de água ultrapura (Figura A13), especialmente nas regiões de fase líquido-expandida do filme (inferiores a 25 mN/m). Para pressões de maior compactação da monocamada de HSt as isotermas na presença da enzima ocuparam áreas por molécula inferior à isoterma do surfactante puro, o que indica a expulsão de material enzimático da região de interface para a subfase aquosa. Assim, mesmo que em subfase aquosa a sinergia entre a enzima e o material surfactante tenha exibido maior sinergia (melhor interação), a subfase de sal continuou sendo utilizada nos experimentos posteriores por permitir a permanência da PDH na interface, mesmo em pressões de alta compactação do filme.

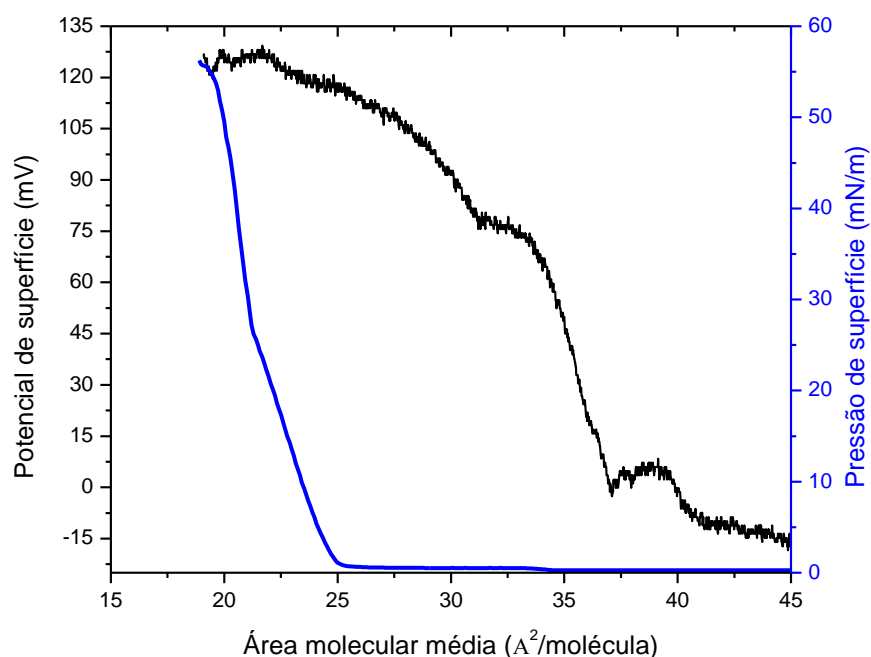
Além da expansão do filme, é possível verificar a partir do gráfico anexo à Figura 26 que a incorporação da PDH também promoveu expressiva alteração nas propriedades plásticas da monocamada de HSt. Quando espalhado sozinho na interface, o filme de HSt apresentou módulo máximo de compressibilidade de 850 mN/m. A inserção da PDH, ainda que na menor das concentrações analisadas, foi capaz de reduzir este valor em 45% (com um novo máximo em 470 mN/m), o que é razoável, uma vez que

muitas macromoléculas são flexíveis, produzindo a diminuição da rigidez de filmes compactos (CASELI et al., 2008; MAGET-DANA, 1999). A concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$  foi adotada como padrão para os experimentos seguintes visto que concentrações superiores a esta produziram filmes altamente fluidos, o que poderia dificultar sua deposição em estruturas do tipo multicamadas.



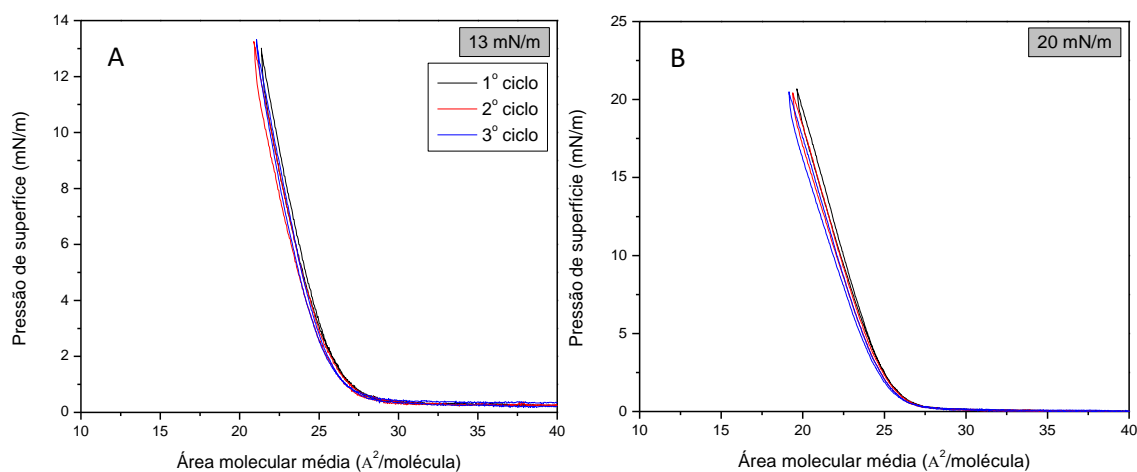
**Figura 26** – Isotermas pressão de superfície-área para o sistema HSt+PDH em diferentes concentrações de enzima. O gráfico em anexo representa os valores calculados para o fator de compressibilidade nas diferentes concentrações.

O potencial de superfície obtido ao longo da compressão isotérmica do filme híbrido é apresentado abaixo na Figura 27. Assim como observado anteriormente para a monocamada de PDH (Figura 10), a curva de potencial apresentou valor negativo de 17 mV em regiões de grande área molecular média. A diminuição da área média disponível para o filme provocou um aumento abrupto do potencial na região de 37  $\text{\AA}^2$ , ainda em fase gasosa, o que está relacionado a contribuição dos momentos de dipolo das moléculas de ácido esteárico, visto que a curva de compressão do surfactante puro na interface (Figura A14) apresentou aumento significativo de potencial na região de mesma área molecular. O aumento de potencial ocorreu de forma menos abrupta até o final da compressão da monocamada, atingindo valor máximo de 125 mV. O potencial máximo observado para o filme híbrido cai em uma faixa de valor intermediária entre os potenciais máximos da monocamada da PDH (80 mV) e da monocamada de HSt (250 mV).

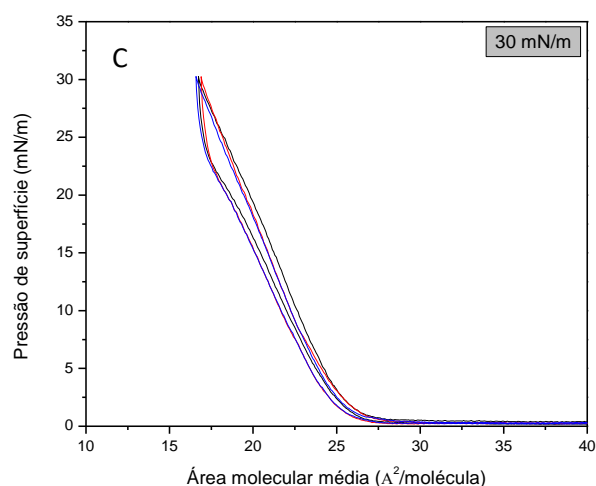


**Figura 27** - Potencial de superfície obtido ao longo da compressão isotérmica do filme híbrido HSt+PDH 300  $\mu\text{g/mL}$  (curva em preto).

Os ciclos de compressão e descompressão obtidos para a monocamada híbrida apresentaram comportamento semelhante ao reportado para a enzima PDH (Figura 14), com boa reversibilidade nos ciclos efetuados a pressões de superfície baixas e intermediárias (Figuras 28A e B) e perda de parte do comportamento elástico evidenciado pela formação de histerese nos ciclos de compressão e descompressão efetuados em pressões superficiais iguais ou superiores a 30 mN/m (Figura 28C). É importante mencionar que o efeito de histerese ocorreu de forma menos pronunciada para o filme híbrido quando em comparação aos mesmos ciclos efetuados para a monocamada de PDH, o que indica que a presença do surfactante diminui a formação de domínios irreversíveis de enzima na interface.

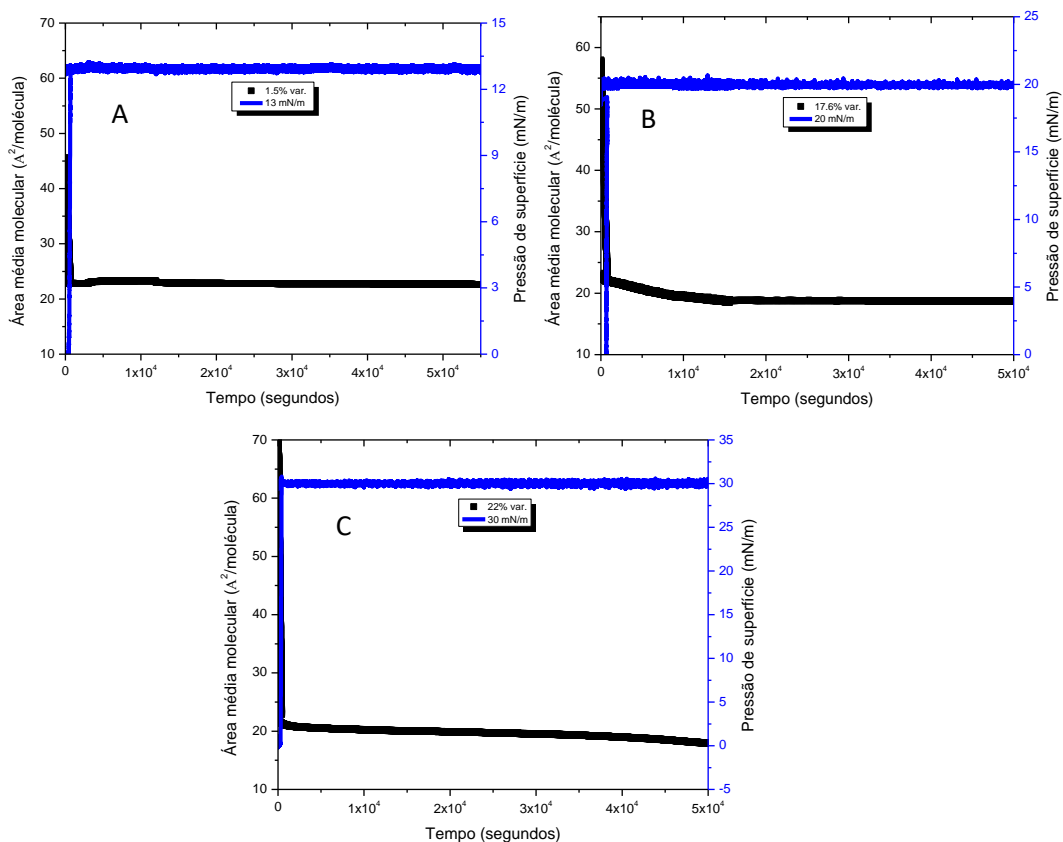






**Figura 28** - Ciclos de compressão e descompressão para o filme misto de HSt+PDH 300 µg/mL em subfase de NaCl 100 mM em pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C).

A Figura 29 apresenta os testes de estabilidade aplicados à monocamada híbrida em diferentes condições de pressão de superfície. Assim como observado anteriormente para a monocamada da enzima pura, o filme híbrido apresentou tendência inversamente proporcional entre estabilidade e a pressão de análise. Para a pressão de superfície inicial de 13 mN/m (Figura 28A) foi verificada uma variação na área molecular do filme de 1.5%, enquanto nas pressões de 20 e 30 mN/m (Figuras 29B e C) as variações foram de 17.6% e 22.0%, respectivamente. A comparação dos valores de variação na área molecular dos filmes para os diferentes casos (filme de PDH puro e na presença de HSt) confirma a interação sinérgica positiva entre a enzima e o surfactante, produzindo um filme com melhor estabilidade na interface.



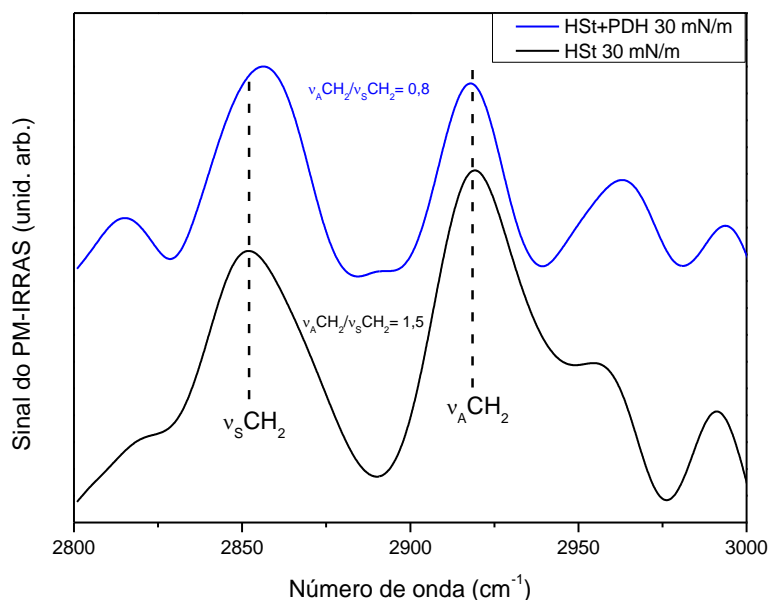
**Figura 29** - Perfis de estabilidade da monocamada mista de HSt+PDH 300µg/mL em subfase de NaCl 100 mM para pressões de superfície baixas (A), intermediárias (B) e altas (C).

A partir deste ponto a discussão irá focar na análise dos resultados para a pressão de 30 mN/m, visto que a partir deste valor o filme apresentou boa compactação na interface, o que consiste em uma característica física importante para o processo de deposição de filmes LB. A Figura 30 apresenta a imagem da morfologia do filme híbrido formado em interface com o auxílio da técnica de BAM. É possível observar a diferença de contraste entre uma fase mais clara (mais condensada) e outra mais escura (menos condensada), o que indica a segregação dos dois compostos do filme. Assim, os domínios de tonalidade mais clara podem ser atribuídos ao filme de HSt, mais compacto, e os domínios mais escuros à presença de material enzimático. Conforme discutido anteriormente, o filme de enzima apresentou aspecto homogêneo tanto em sua fase gasosa quanto em sua fase líquido-expandida com presença de domínios atribuídos à segregação de fases somente na região de “decolagem” da isoterma de pressão de superfície-área, o que também foi observado para o filme do anfifílico na interface, apresentando aspecto heterogêneo somente na transição entre suas fases gás e líquido-expandida (Figura A16).



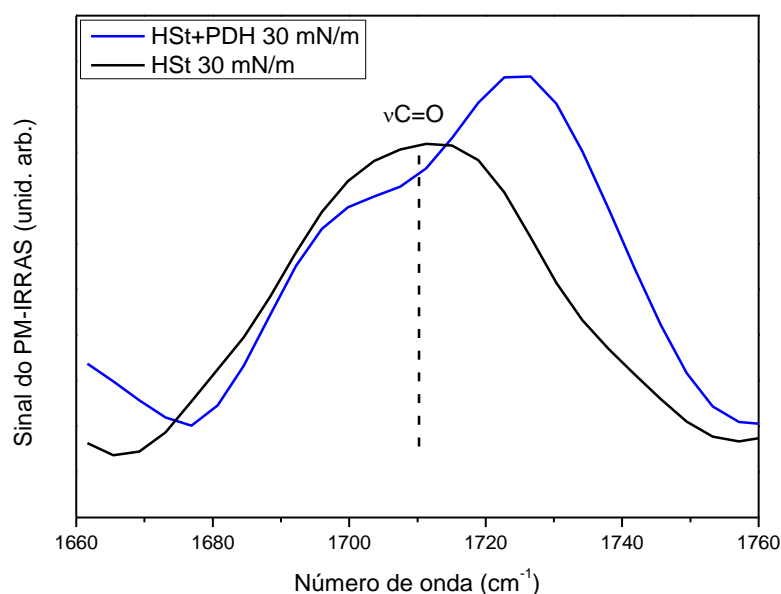
**Figura 30** – Microscopia no ângulo de Brewster para a monocamada mista de HSt+PDH 300  $\mu\text{g/mL}$  na pressão de 30 mN/m. Resolução de 3600 x 4000  $\mu\text{m}$ .

O grau de empacotamento e orientação das cadeias hidrofóbicas da molécula de HSt foram acessadas na região de 2800 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  do infravermelho, conforme apresentado na Figura 31. As principais bandas destacadas correspondem aos estiramentos simétrico (2850  $\text{cm}^{-1}$ ) e assimétrico (2920  $\text{cm}^{-1}$ ) dos grupos  $\text{CH}_2$ . É possível observar que na presença da enzima PDH o espectro do anfifílico apresentou importantes alterações em sua estrutura de bandas, como o deslocamento da banda de estiramento simétrico para maiores número de onda e a diminuição na intensidade relativa do estiramento assimétrico. O primeiro caso está relacionado a um aumento do número de confôrmeros *gauche*, que absorvem radiação infravermelha em maiores frequências (MENDELSON; BRAUNER; GERICKE, 1995), como resultado da interação hidrofóbica entre as cadeias polipeptídicas da enzima e a região apolar do filme do anfifílico. O segundo caso mede a desordem nos grupos apolares a partir da razão entre as intensidades dos sinais dos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, denominado parâmetro de ordem (PEREIRA et al., 2018). Conforme apresentado na Figura 31, o parâmetro de ordem apresentou uma redução de 1,5 para 0,75 na presença da enzima, reforçando assim o aumento na desordem das cadeias apolares do HSt. O efeito de desorganização do filme de HSt também foi observado em água (Figura A17), porém, em menor extensão por conta da menor penetração da enzima na interface.



**Figura 31** - Espectros de PM-IRRAS na região de 2800 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  para a monocamada de HSt+PDH 300  $\mu\text{g/mL}$  em subfase de NaCl 100 mM na pressão de superfície de 30 mN/m.

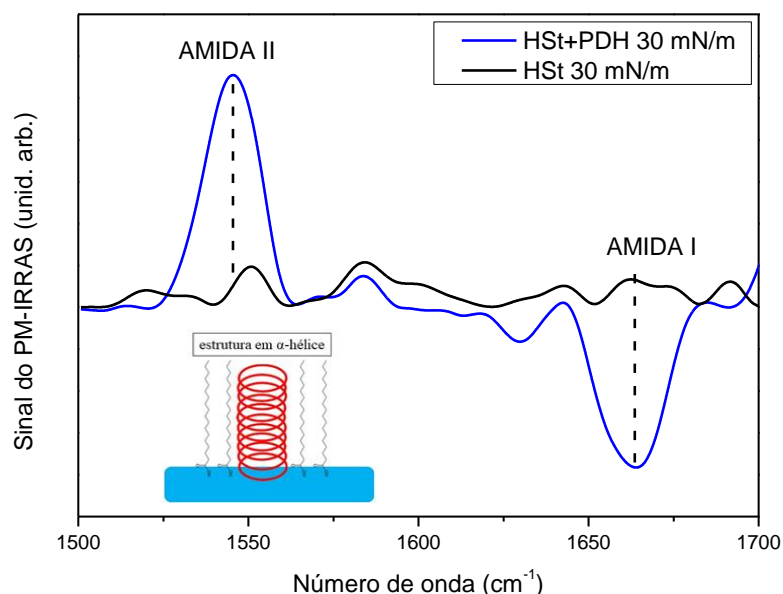
Informações importantes a respeito da hidratação da região polar do filme de HSt foram obtidas através da análise do espectro na região do estiramento da carbonila, conforme apresentado na Figura 32. É possível observar que na presença da PDH a banda do estiramento  $\text{C=O}$  apresentou um deslocamento do seu valor máximo de 1710 para 1724  $\text{cm}^{-1}$ , o que está relacionado a uma diminuição na hidratação ao redor deste grupo (BLUME; HIIBNER; MESSNER, 1988; HÜBNER; BLUME, 1998). Ainda assim, o ombro em 1698  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de alguns grupos hidratados na interface. De maneira similar, a enzima também provocou efeito de desidratação no entorno dos grupos carbonilas quando adsorvida a partir da subfase de água ultrapura (Figura A18).



**Figura 32** - Espectros de PM-IRRAS na região de 1660 a 1760  $\text{cm}^{-1}$  para a monocamada de HSt+PDH 300  $\mu\text{g/mL}$  em subfase de NaCl 100 mM na pressão de superfície de 30 mN/m.

A região do espectro destacada na Figura 33 apresenta a região dos grupos amida I e II presentes na PDH. Assim como observado anteriormente para o filme da enzima pura na interface (Figura 17) as bandas amida I e II apresentaram maior intensidade em faixas de número de onda referentes à estrutura em  $\alpha$ -hélice da PDH em 1660 e 1540  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, a presença de uma banda de absorção bem definida em 1630  $\text{cm}^{-1}$  também é indicativo da presença de estruturas do tipo  $\beta$ -folha. É importante mencionar que a inversão na orientação da banda referente à amida I (negativa em relação à linha base do espectro) indica uma orientação preferencialmente perpendicular dessa estrutura na presença do HSt, o que está relacionado à alterações conformacionais da estrutura secundária da enzima por meio de interações hidrofóbicas ocorrendo entre suas cadeias polipeptídicas e as cadeias apolares do ácido carboxílico, conforme exemplificado na imagem em anexo na Figura 33 (SCHMIDT et al., 2008b).

Wang et al estudaram de forma detalhada o processo de adsorção da enzima glicose oxidase em diferentes interfaces. Os autores reportaram que fatores como o tempo, a presença ou não de surfactantes na interface e a compressão da enzima podem levar a importantes alterações em suas principais estruturas secundárias (WANG et al., 2011, 2012). Conforme observado, os processos de adsorção e compressão da enzima PDH na presença da monocamada de HSt foram capazes de manter a conformação da estrutura  $\alpha$ -hélice da enzima, apesar da alteração em sua orientação na interface.



**Figura 33** - Espectros de PM-IRRAS na região de 1500 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  para a monocamada de HSt+PDH 300  $\mu\text{g/mL}$  em subfase de NaCl 100 mM na pressão de superfície de 30 mN/m.

Monocamadas estáveis do filme híbrido foram transferidas na pressão de 30 mN/m como filmes LB do tipo Y (deposições nas retiradas e imersões do substrato) na superfície de diferentes suportes sólidos como vidro, quartzo e moscovita, produzindo estruturas em mono e multicamadas com taxas de transferências próximas a 1 para filmes até 15 camadas. A tabela A1 apresenta um resumo com os valores médios de taxa de transferência obtidos na deposição do filme híbrido em diferentes suportes sólidos.

A técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM) foi aplicada ao estudo da imobilização dos filmes puros de PDH e HSt, bem como do filme híbrido produzido entre os dois compostos. Primeiramente descrita por Sauerbrey a técnica relaciona a variação de frequência ( $\Delta f$ ) produzida em um transdutor de quartzo após a deposição de certa massa ( $m$ ), de acordo com a equação 12:

$$\Delta f = -C_f \Delta m_f \quad (12)$$

em que  $C_f$  corresponde ao fator de sensibilidade, uma constante que resume alguns parâmetros físicos do cristal de quartzo como a sua frequência fundamental de oscilação, seu modo de cisalhamento, sua densidade de massa e sua área ativa. A equação de Sauerbrey é válida dentro de alguns limites específicos e a deposição de materiais com baixa rigidez pode causar desvios na relação linear entre  $\Delta f$  e  $\Delta m$ , especialmente quando se deseja trabalhar com materiais biológicos.

A tabela 6 apresenta os valores de densidade de massa calculados para filmes com diferentes composições depositados sobre o cristal da microbalança. Nota-se que devido à sua maior compactação e rigidez, o filme imobilizado do composto anfifílico apresentou maior densidade de massa quando em

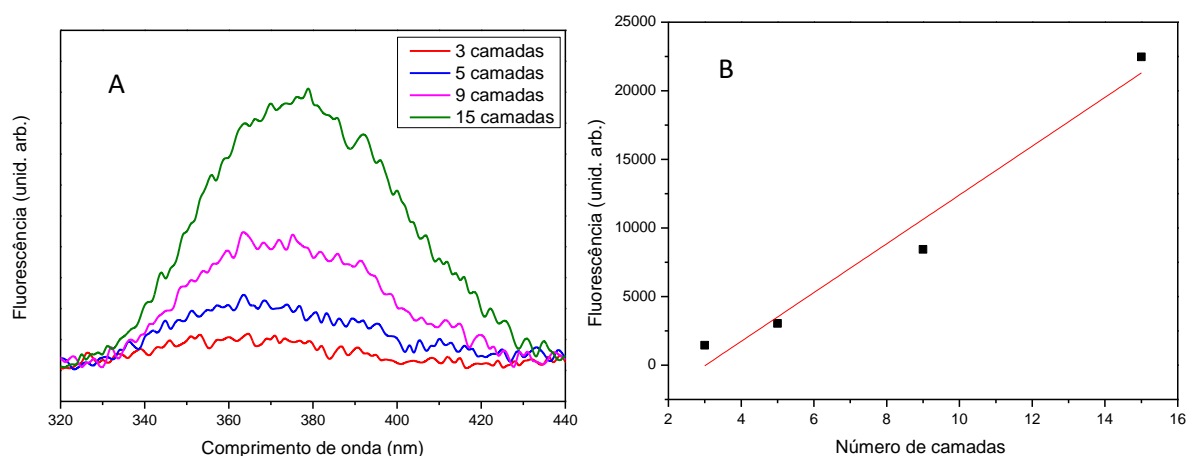
comparação ao filme depositado de enzima, ao passo que a deposição de ambos os compostos deu origem a um filme com densidade de massa intermediária. Os valores calculados de massa transferida foram obtidos utilizando-se a área ativa do eletrodo de ouro 0,40 cm<sup>2</sup>. É importante salientar que os dados apresentados na tabela 6 referem-se à uma única camada de filme depositada sobre o sensor da balança de quartzo, visto que tentativas de deposição em multicamadas resultaram em estruturas com taxas de transferência próximas a zero. Tal fato está possivelmente atrelado à baixa adesão da enzima à superfície de ouro presente no sensor, o que inviabilizou a produção de resultados confiáveis para análises de crescimento em multicamadas dos filmes via QCM.

A deposição do filme híbrido foi acompanhada através de experimentos de ressonância de plásmons de superfície (SPR), apresentados na Figura A19. As variações no índice de refração dos substratos de ouro, apresentadas na Figura A20, indicaram uma espessura aproximada de 14 nm para o filme LB híbrido com 5 camadas. Estudos prévios de SPR efetuados em LBs do mesmo anfifílico (GRANQVIST et al., 2013) indicaram uma espessura média de 2,60 nm por monocamada de HSt. Assim, a espessura média de 2,80 nm obtida para as 5 camadas do filme híbrido confirmando a baixa adesão do material enzimático em superfícies de ouro.

**Tabela 6** – Dados de deposição dos filmes LB via técnica de nanogravimetria por balança de quartzo.

Composição do filme (30 mN/m)	Densidade de massa (µg/cm <sup>2</sup> )	Massa transferida (ng)
PDH	0,71	283
HSt	1,24	495
HSt+PDH	0,88	353

O crescimento do filme híbrido foi acompanhado então pela sua deposição em suportes de quartzo acompanhando a emissão dos grupos triptofano presentes na enzima PDH quando excitados a um comprimento de onda de 280 nm, conforme apresentado na Figura 34A. Assim como reportado anteriormente para o filme da enzima pura imobilizada no suporte sólido de quartzo, o máximo de emissão dos grupos triptofano do filme híbrido ocorreu em 375 nm, com um aumento de intensidade proporcional ao número de camadas depositadas. A tendência apresentada na Figura 33B indica que a quantidade de material enzimático imobilizado cresce proporcionalmente à medida que o número de camadas transferidas para o suporte aumenta. Assim como observado para a PDH, outros estudos também reportaram o deslocamento da emissão de grupos triptofano para maiores comprimentos de onda (CASELI et al., 2008; SCHMIDT et al., 2008b).

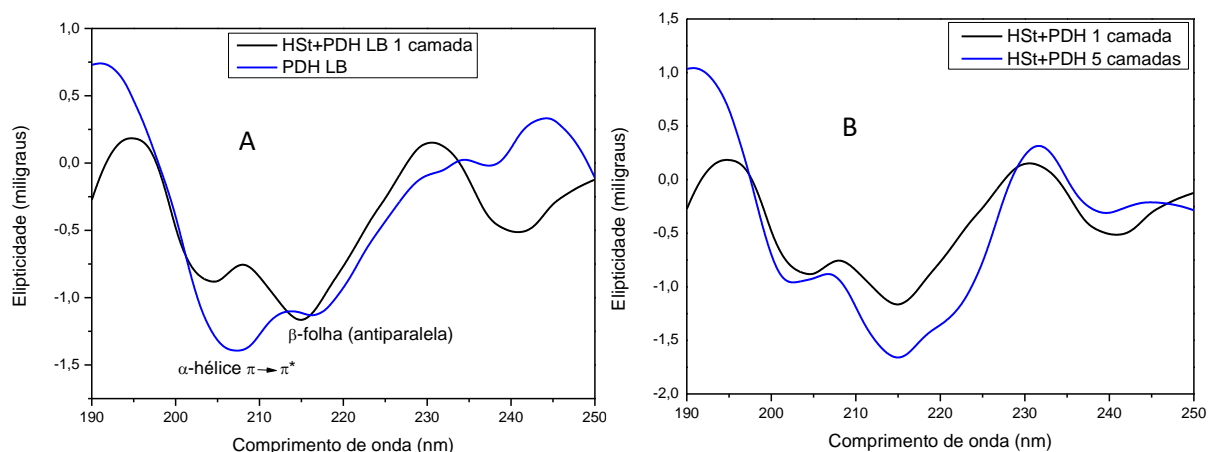


**Figura 34** – Espectros de emissão por fluorescência dos filmes LB de HSt+PDH com diferentes números de camadas depositadas (A) e a correlação existente entre o sinal de emissão e o número de camadas (B).

A Figura 35A apresenta a comparação dos espectros de dichroísmo circular para os filmes LB de uma única camada de enzima depositada em sua forma pura (curva em azul), e na presença do surfactante (curva em preto). As principais alterações no padrão de absorção da enzima ocorreram na região de 200 a 220 nm, sensível às estruturas em  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha. Conforme discutido anteriormente, mesmo após os processos de espalhamento e imobilização do filme da enzima PDH a enzima manteve suas estruturas em  $\alpha$ -hélice bem preservadas (Figura 22). Nota-se que na presença do surfactante, o espectro da enzima apresenta uma acentuada diminuição da banda de absorção na região da transição  $\pi$ - $\pi^*$  referente a estrutura em  $\alpha$ -hélice e o surgimento da banda de absorção negativa em 215 nm, relacionada a estruturas do tipo  $\beta$ -folha. Outro fator que serve de reforço a alteração estrutural sofrida pela PDH diz respeito as bandas positivas abaixo de 200 nm, que apresentam um deslocamento de 193 nm ( $\alpha$ -hélice) para 195 nm ( $\beta$ -folha) (LOUIS-JEUNE; ANDRADE-NAVARRO; PEREZ-IRATXETA, 2012).

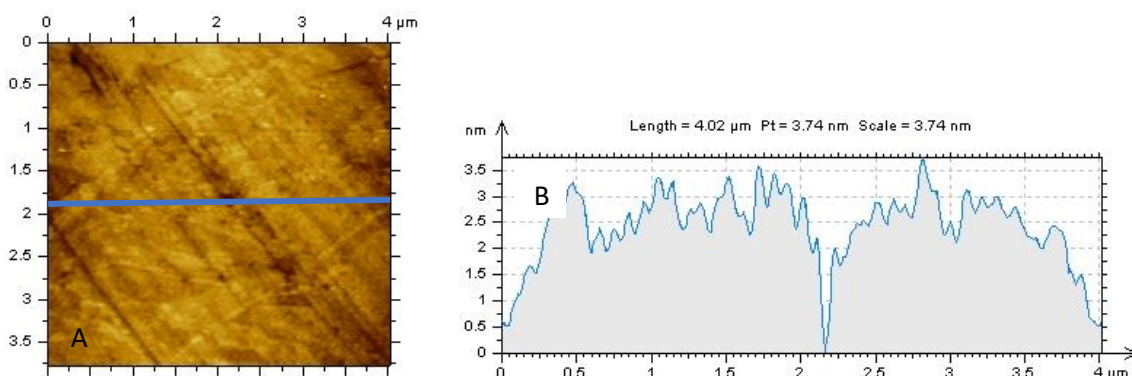
Um padrão similar de bandas também foi observado para o filme híbrido quando depositado em multicamadas, conforme apresentado na Figura 35B, o que indica uma boa replicação da estrutura secundária da enzima em todas as camadas depositadas. Contudo, a presença do ombro em 222 nm e o deslocamento da banda positiva para 193 nm indicam também a presença, ainda que discreta, de estruturas em  $\alpha$ -hélice, que podem surgir a partir de interações entre domínios da enzima presentes em diferentes camadas do filme depositado.

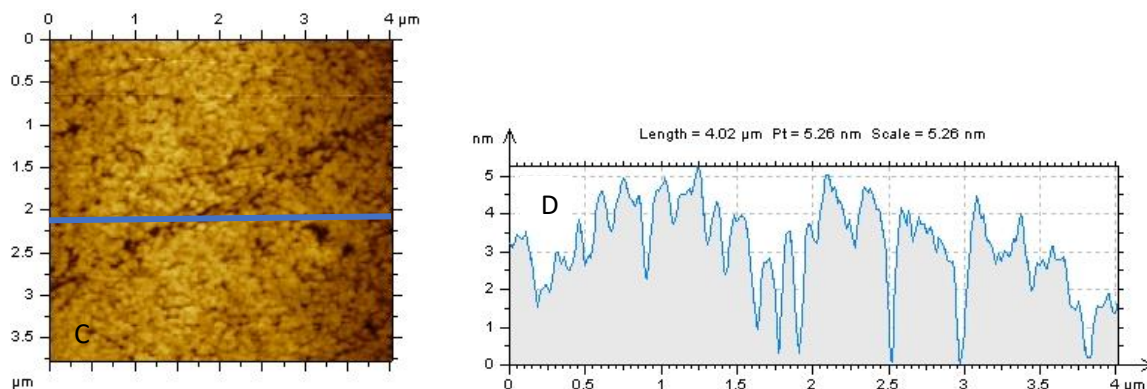




**Figura 35** – Comparação entre espectros de dicroísmo circular dos filmes LB de PDH (curva em preto) e quando depositada na forma de monocamada sob a superfície de um suporte sólido de quartzo (curva em azul).

As imagens de microscopia das Figuras 36A e 36C apresentam as morfologias exibidas pelos filmes com uma única camada depositada de ácido esteárico puro e na presença da PDH, respectivamente. Nota-se que o filme de material surfactante apresentou aspecto liso e regular, com uma espessura próxima de 2,5 nm, conforme indicado pelo perfil de alturas extraído da secção transversal na Figura 36B (linha azul). O filme híbrido, por sua vez, exibiu morfologia de aparência irregular, evidenciada pelo aspecto rugoso apresentado pela microscopia da imagem 36C e confirmado também pelo perfil de alturas extraído do filme (Figura 36D). Os valores da espessura do filme oscilaram entre 2,5 e 5 nm, o que pode indicar regiões com predominância de HSt alternadas por regiões com a presença do material enzimático, respectivamente.

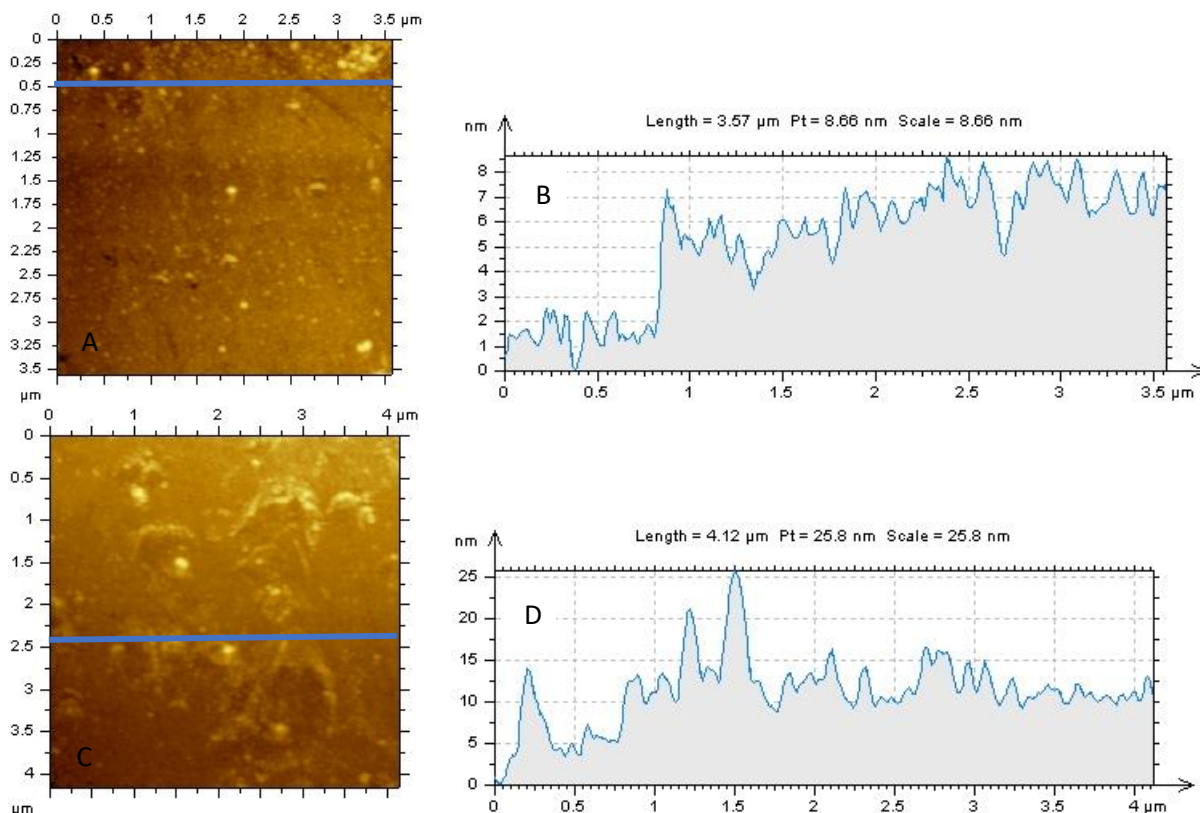




**Figura 36** - Microscopia de força atômica de uma camada de HSt depositada sobre mica (A) e seu perfil de relevo destacado em azul (B). Microscopia de força atômica de uma camada do filme híbrido de HSt e PDH depositada sobre mica (C) e seu perfil de relevo destacado em azul (D).

A mesma análise pode ser feita a respeito dos resultados em que a deposição dos filmes ocorreu em estruturas do tipo multicamada, conforme apresentado nas Figuras 37A e 37C para os filmes LB de HSt e o filme híbrido, respectivamente. Assim como verificado anteriormente para o filme de uma camada, o filme em multicamadas também apresentou padrão liso e regular após a sua deposição (Figura 37A). A diferença de contraste presente na parte superior da imagem de microscopia foi utilizada como referência na obtenção de seu perfil de altura. Nota-se que na região mais escura (primeiros 0,80 nm) o filme apresentou espessura média de 2 nm, enquanto outras regiões apresentaram espessuras até quatro vezes maiores, indicando a presença de áreas com melhor deposição de HSt.

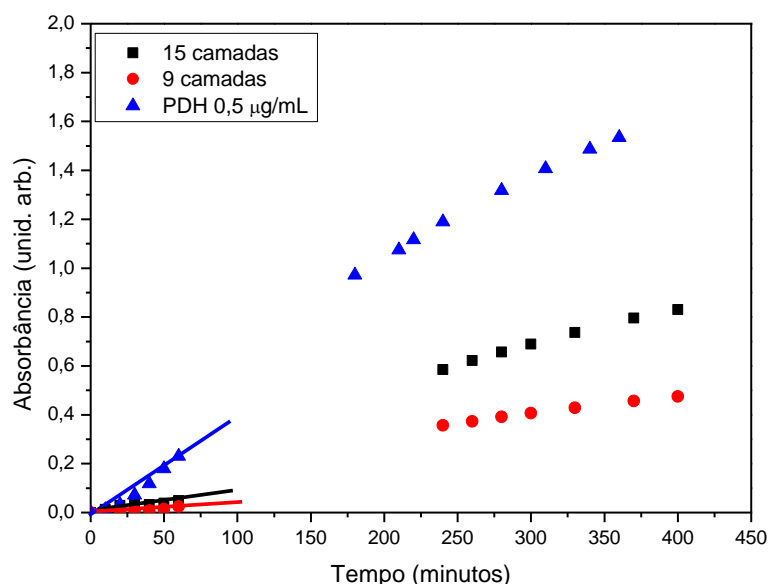
A Figura 37C apresenta a imagem de microscopia obtida para o filme LB híbrido depositado em multicamadas. Seguindo a tendência observada anteriormente nos filmes com apenas uma camada, é possível identificar uma morfologia irregular e de aspecto rugoso causada pela presença da enzima em camadas mais profundas da estrutura do filme. O recorte da seção transversal (Figura 37D) indicou uma maior espessura para o filme híbrido quando em comparação ao filme em multicamadas para o HSt puro, com uma altura média entre 10 e 12 nm nas regiões de maior regularidade do filme, atingindo valores máximos entre 10 e 25 nm em regiões de deposição com menor regularidade.



**Figura 37** - Microscopia de força atômica de cinco camadas de HSt depositadas sobre mica (A) e seu perfil de relevo destacado em azul (B). Microscopia de força atômica de cinco camadas do filme híbrido de HSt e PDH depositadas sobre mica (C) e seu perfil de relevo destacado em azul (D).

### 4.3. Estudos da atividade enzimática da PDH

A capacidade do filme LB em detectar o aminoácido fenilalanina foi acompanhada pelo acréscimo no sinal de absorvância da forma reduzida do cofator enzimático  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$ ) em 340 nm, conforme representado no espectro da Figura A21. A atividade da PDH foi medida em filmes com 1, 5, 9 e 15 camadas. É possível notar que filmes com maior número de camadas apresentaram também maiores valores de atividade enzimática, ao passo que os filmes mais finos não apresentaram atividade suficiente para ser detectada dentro do tempo experimental por conta da baixa quantidade de enzima imobilizada nos suportes, conforme apresentado na Figura 38.



**Figura 38** – Variação da absorbância em 340 nm *versus* tempo de reação para a concentração total de 2,5 mM de L-fenilalanina.

Foi observado também que ao longo dos primeiros 60 minutos experimentais o sinal de absorbância cresceu linearmente com o tempo, o que permite estimar a variação de absorbância por unidade de tempo para os diferentes filmes. Os valores calculados são apresentados abaixo, na Tabela 7. Apesar da atividade enzimática da PDH ser consideravelmente menor quando imobilizada como um filme LB a variação produzida no sinal de absorbância foi suficiente para detectar o aminoácido em uma concentração de 2,5 mM. Uma vez que a enzima se encontra imobilizada na superfície de um suporte sólido, importantes alterações em sua conformação são esperadas. Além disso, o alto grau de compactação do HSt pode dificultar o acesso do aminoácido ao sítio catalítico da enzima, afetando os parâmetros cinéticos da reação. A perda de parte da atividade catalítica da enzima também deve ser levada em consideração, o que é frequentemente relatado para sensores de filmes LB devido a restrições em termos da mobilidade do polipeptídeo que forma o núcleo da enzima (BARBOSA; CASELI; PÉRES, 2016; CASELI et al., 2008). Apesar disso, o limite de detecção apresentado pelo filme foi baixo o suficiente para detectar o aminoácido em concentrações muito inferiores às encontradas em amostras de urina de pacientes acometidos pela fenilcetonúria (20 a 60 mM) (WEISS et al., 2007). Assim, foi possível verificar, como prova de conceito, que a produção de filmes de Langmuir estáveis da enzima PDH na presença de ácido esteárico podem ser utilizados na construção de filmes Langmuir-Blodgett capazes de detectar o aminoácido L-fenilalanina.

**Tabela 7** – Valores de atividade enzimática da PDH ao longo de 60 minutos experimentais em diferentes condições.

Sistema	Atividade enzimática ( $\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}}/\text{min}$ )
Meio homogêneo (PDH 0,5 µg/mL)	$3,97 \times 10^{-3}$
Filme LB 15 camadas	$0,72 \times 10^{-3}$
Filme LB 9 camadas	$0,30 \times 10^{-3}$

## 5. CONCLUSÕES

O estudo da físico-química de formação dos filmes de superfície da enzima PDH apontou a importante contribuição do efeito de relargagem na formação de monocamadas reprodutíveis e com boa estabilidade na interface. Dados espectroscópicos indicaram a formação de filmes com morfologia homogênea e predominância de estruturas do tipo  $\alpha$ -hélice paralelamente alinhadas ao plano da interface. Taxas de transferência próximas a unidade indicaram boa deposição do filme da enzima PDH em suportes sólidos em altas pressões de superfície, com a manutenção de estruturas em  $\alpha$ -hélice da enzima, indicado por dados de espectroscopia por dicroísmo circular. A enzima se inseriu regularmente em monocamadas do surfactante HSt, alterando a consideravelmente a hidratação dos grupos carbonila do anfifílico e aumentando a desordem na região de suas cadeias apolares. A elevada pressão de exclusão de 25,3 mN/m e a sinergia positiva entre os componentes levou a produção de filmes com estabilidade termodinâmica. O acompanhamento das principais estruturas secundárias da PDH indicou a presença majoritária de estruturas do tipo  $\alpha$ -hélice na presença do surfactante, porém, desta vez, com orientação preferencialmente perpendicular ao plano da interface. Os filmes mistos PDH-HSt foram transferidos com sucesso para suportes sólidos de quartzo, apresentando taxas de transferência próximas à unidade, e produzindo filmes LB com arquitetura do tipo Y com um máximo de 15 camadas. Imagens de AFM indicaram a formação de filmes com alta rugosidade, atribuída principalmente à presença da PDH. Interações entre a enzima e ácido carboxílico produziram importantes alterações conformacionais na estrutura secundária da PDH conforme evidenciado pelas alterações no espectro de dicroísmo circular da enzima, indicando também a presença de estruturas do tipo folhas- $\beta$ . A capacidade do filme LB em detectar o aminoácido L-fenilalanina foi proporcional ao número de camadas depositadas sobre os suportes de quartzo, sendo que somente para estruturas superiores a 9 camadas a cinética pode ser determinada em tempo viável para a aplicação do dispositivo como sensor. O presente trabalho mostrou pela primeira vez que filmes estáveis da enzima PDH na presença de ácido esteárico podem ser depositados sobre a superfície de suportes sólidos como filmes de Langmuir-Blodgett para a detecção do aminoácido L-fenilalanina utilizando a técnica de espectroscopia no UV-vis. Assim, os dados aqui apresentados servem de referência para que estudos futuros possam melhorar o desempenho do biossensor ao produzir novas estruturas de imobilização da enzima PDH em meio a diferentes matrizes.

## 6. REFERENCIAS

- ÁBRAHÁM, N. et al. Interaction of biofunctionalized gold nanoparticles with model phospholipid membranes. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 10, p. 2715–2725, 2014.
- ALI, S. et al. Acyl chain-length asymmetry alters the interfacial elastic interactions of phosphatidylcholines. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 1, p. 338–348, 1998.
- AMBROSE, J. A. et al. A study of the fluorometric method for phenylalanine in serum samples. **Clinica Chimica Acta**, v. 15, n. 3, p. 493–503, 1967.
- ARAUJO, F. T.; PERES, L. O.; CASELI, L. Conjugated Polymers Blended with Lipids and Galactosidase as Langmuir-Blodgett Films to Control the Biosensing Properties of Nanostructured Surfaces. **Langmuir**, v. 35, n. 22, p. 7294–7303, 2019.
- ARIMA, A. A. et al. The negligible effects of the antifungal natamycin on cholesterol-dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers may explain its low oral and topical toxicity for mammals. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 202–208, 2014.
- ASANO, Y. Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. **Choice Reviews Online**, v. 48, n. 03, p. 48-1218-48–1218, 2010.
- ASANO, Y.; NAKAZAWA, A.; ENDO, K. Novel phenylalanine dehydrogenases from *Sporosarcina ureae* and *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 21, p. 10346–10354, 1987.
- ATHERTON, N. D. HPLC measurement of phenylalanine by direct injection of plasma onto an internal-surface reversed-phase silica support. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 975–978, 1989.
- AVASHIA, Y. J.; THALLER, S. R. **Principles of plastic surgery portrayed by the professional life of Dr John Peter Mettauer**. [s.l: s.n.]. v. 22
- AYOUB, F. DE P.; CASELI, L. Controlling the molecular architecture of lactase immobilized in Langmuir-Blodgett films of phospholipids to modulate the enzyme activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 8–14, 2017.
- BAKSHI, M. S. et al. Metal nanoparticle pollutants interfere with pulmonary surfactant function in vitro. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 3, p. 855–868, 2008.
- BARBOSA, C. G.; CASELI, L.; PÉRES, L. O. Conjugated polymers nanostructured as smart interfaces for controlling the catalytic properties of enzymes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 476, p.

206–213, 2016.

BARBOSA, H. et al. Interaction of dicentrinone, an antitrypanosomal aporphine alkaloid isolated from *Ocotea puberula* (Lauraceae), in cell membrane models at the air-water interface. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, 2020.

BARNES, G. T.; GENTLE, I. R. **Interfacial Science. An Introduction**. [s.l: s.n.].

BEHROOZI, F. Theory of elasticity in two dimensions and its application to Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 12, n. 9, p. 2289–2291, 1996.

BLAUDEZ, D. et al. Characterization of Langmuir-Blodgett monolayers using polarization modulated FTIR spectroscopy. **Thin Solid Films**, v. 210–211, n. PART 2, p. 648–651, 1992.

BLAUDEZ, D.; CASTANO, S.; DESBAT, B. PM-IRRAS at liquid interfaces. In: **Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy**. [s.l: s.n.]. p. 27–55.

BLODGETT, K. B. Monomolecular films of fatty acids on glass. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 495, 1934.

BLUME, A.; HIIBNER, W.; MESSNER, G. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of  $^{13}\text{C}=0$ -labeled Phospholipids Hydrogen Bonding To Carbonyl Groups. **Biochemistry**, v. 27, n. 21, p. 8239–8249, 1988.

BOURGUE, A. J.; KRULL, I. S. Solid-phase reagent containing the 3,5-dinitrophenyl tag for the improved derivatization of chiral and achiral amines, amino alcohols and amino acids in high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 537, n. C, p. 123–152, 1991.

BROCKMAN, H. Lipid monolayers: Why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 4, p. 438–443, 1999.

BRUNHUBER, N. M. W. et al. Cloning, sequencing, and expression of *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase. Sequence comparisons to amino-acid dehydrogenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 23, p. 16203–16211, 1994.

CALVEZ, P. et al. Analysis of the contribution of saturated and polyunsaturated phospholipid monolayers to the binding of proteins. **Langmuir**, v. 27, n. 4, p. 1373–1379, 2011.

CAO, X. et al. Surface chemistry and spectroscopic and microscopic properties of organophosphorus hydrolase langmuir and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 18, n. 20, p. 7616–7622, 2002.

CASELI, L. et al. Using phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 1, p. 100–108, 2008.

CASELI, L. Enzymes immobilized in langmuir-blodgett films: Why determining the surface properties in langmuir monolayer is important? **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 1, p. 631–644, 2018.

CHANDLER, H. M. et al. An investigation of the use of urease-antibody conjugates in enzyme immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 53, n. 2, p. 187–194, 1982.

CHEN, K. L.; BOTHUN, G. D. Nanoparticles meet cell membranes: Probing nonspecific interactions using model membranes. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 873–880, 2014.

DAVIES, J. T. The distribution of ions under a charged monolayer, and a surface equation of state for charged films. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences**, v. 208, n. 1093, p. 224–247, 1951.

DAVIES, J. T. A surface equation of state for charged monolayers. **Journal of Colloid Science**, v. 11, n. 4–5, p. 377–390, 1956.

DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. Properties of Monolayers. In: **Interfacial Phenomena**. [s.l: s.n.]. p. 217–281.

DE MARQUI, A. B. T. **Panorama da triagem neonatal para fenilcetonúria no Brasil** **Medicina (Brazil)**, 2016.

DEWITT, B. N.; DUNN, R. C. Interaction of cholesterol in ternary lipid mixtures investigated using single-molecule fluorescence. **Langmuir**, v. 31, n. 3, p. 995–1004, 2015.

DICKO, A.; BOURQUE, H.; PÉZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1–2, p. 125–139, 1998.

DZIRI, L.; PUPPALA, K.; LEBLANC, R. M. Surface and spectroscopic properties of acetylcholinesterase monolayer at the air/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 194, n. 1, p. 37–43, 1997.

FERREIRA, M. et al. Langmuir and langmuir-blodgett films of polyfluorenes and their use in polymer light-emitting diodes. **Journal of Polymer Research**, v. 14, n. 1, p. 39–44, 2007.

FORREST, S. R. **The path to ubiquitous and low-cost organic electronic appliances on plastic** **Nature**,



2004.

GADISA, A. et al. Improvements of fill factor in solar cells based on blends of polyfluorene copolymers as electron donors. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 5, p. 3126–3131, 2007.

GERALDO, V. P. N. et al. Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids. **Chemical Physics Letters**, v. 559, p. 99–106, 2013.

GIROTTI, S. et al. Bioluminescent flow sensor for L-phenylalanine determination in serum. **Talanta**, v. 40, n. 3, p. 425–430, 1993.

GONG, K. et al. Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 207, n. 1–3, p. 113–125, 2002.

GRANQVIST, N. et al. Characterizing ultrathin and thick organic layers by surface plasmon resonance three-wavelength and waveguide mode analysis. **Langmuir**, v. 29, n. 27, p. 8561–8571, 2013.

GREENLER, R. G. Infrared study of adsorbed molecules on metal surfaces by reflection techniques. **The Journal of Chemical Physics**, v. 44, n. 1, p. 310–315, 1966.

GUBICA, T. et al. Enhanced enzymatic activity of phenylalanine dehydrogenase caused by cyclodextrins. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 89–94, 2015.

GÜNES, S.; NEUGEBAUER, H.; SARICIFTCI, N. S. **Conjugated polymer-based organic solar cells** *Chemical Reviews*, 2007.

GUO, X.; BAUMGARTEN, M.; MÜLLEN, K. **Designing  $\pi$ -conjugated polymers for organic electronics** *Progress in Polymer Science*, 2013.

GUSTAFSSON, G. et al. Flexible light-emitting diodes made from soluble conducting polymers. **Nature**, v. 357, n. 6378, p. 477–479, 1992.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. a Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. **Pediatrics**, v. 32, p. 338–343, 1963.

HAAS, H. et al. Interaction of dipyridamole with phospholipid monolayers at the air-water interface: Surface pressure and grazing incidence X-ray diffraction studies. **Chemical Physics Letters**, v. 335, n. 5–6, p. 510–516, 2001.

HERCULANO, R. D. et al. The lipid composition of a cell membrane modulates the interaction of an

antiparasitic peptide at the air-water interface. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 7, p. 1907–1912, 2011.

HILL, J. B. et al. an Automated Procedure for Blood Phenylalanine. **Clinical chemistry**, v. 11, p. 541–546, 1965.

HU, B. et al. Pressure dependence of the photoluminescence of polyparaphenylene. **Physical Review B**, v. 43, n. 17, p. 14001–14008, 1991.

HÜBNER, W.; BLUME, A. Interactions at the lipid-water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1–2, p. 99–123, 1998.

HUMMEL, W.; SCHÜTTE, H.; KULA, M. R. Enzymatic determination of l-phenylalanine and phenylpyruvate with l-phenylalanine dehydrogenase. **Analytical Biochemistry**, v. 170, n. 2, p. 397–401, 1988.

KANNO, S.; FURUYAMA, A.; HIRANO, S. Effects of eicosane, a component of nanoparticles in diesel exhaust, on surface activity of pulmonary surfactant monolayers. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 11, p. 841–850, 2008.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 39, n. 9, p. 1848–1906, 1917.

LANGMUIR, I. Two-dimensional gases, liquids and solids. **Science**, v. 84, n. 2183, p. 379, 1936.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374–381, 2012.

LUCASSEN, J.; VAN DEN TEMPEL, M. Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. **Chemical Engineering Science**, v. 27, n. 6, p. 1283–1291, 1972.

MAGET-DANA, R. **The monolayer technique: A potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1999.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 1, p. 59–74, 2006.

MATÉ, S. M. et al. Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for Escherichia coli alpha-hemolysin: A real-time study. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**,

v. 1838, n. 7, p. 1832–1841, 2014.

MATSUOKA, Y. et al. **Visualizing polarization structure of lipid Langmuir monolayer by surface second-harmonic generation technique**. *Thin Solid Films*. **Anais...**2014

MCCAMAN, M. W.; ROBINS, E. Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 59, n. 5, p. 885–890, 1962.

MEHROTRA, P. **Biosensors and their applications - A review***Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 2016.

MENDELSON, R.; BRAUNER, J. W.; GERCKE, A. External Infrared Reflection Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air-Water Interface. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 305–334, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/fenilcetonuria-pku>. Acesso em: 18/06/2020.

MITEVA, T. et al. Improving the performance of polyfluorene-based organic light-emitting diodes via end-capping. **Advanced Materials**, v. 13, n. 8, p. 565–570, 2001.

NAGHIB, S. M.; RABIEE, M.; OMIDINIA, E. Electrochemical biosensor for L-phenylalanine based on a gold electrode modified with graphene oxide nanosheets and chitosan. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 5, p. 2341–2353, 2014.

NEONATAL, B. M. DA S. S. DE A. À S. D. DE A. E. C.-G. DE M. C. A. P. N. DE T. **Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal TT - Technical rules and operational routines of the Neonatal Screening National Program**A. **Normas e Manuais Técnicos**, 2004. Disponível em:

<[http://www.sbp.com.br/pdfs/Manual\\_Normas\\_Operacionais\\_Triagem\\_Neonatal.pdf](http://www.sbp.com.br/pdfs/Manual_Normas_Operacionais_Triagem_Neonatal.pdf)>0A[http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/04\\_0808\\_M2.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/04_0808_M2.pdf)>

NOBRE, T. M. et al. **Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models***Thin Solid Films*, 2015.

OHTA, Y. et al. Membrane properties of binary and ternary systems of ganglioside G M1/dipalmitoylphosphatidylcholine/dioleoylphosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 34, n. 3, p. 147–153, 2004.

OLIVATI, C. A. et al. Light emitting diodes containing Langmuir-Blodgett films of copolymer of a

poly(p-phenylene-vinylene) derivative and poly(octaneoxide). **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2432–2435, 2008.

OMIDINIA, E. et al. Covalent immobilization of phenylalanine dehydrogenase on glutaraldehydmodified poly (3,4-ethylenedioxy) thiophene: Poly(styrenesulfonate)/ polyvinyl alcohol conducting polymer composite films for electrochemical detection of L-phenylalanine. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, v. 5, n. 5, p. 597–608, 2013.

OMIDINIA, E. et al. Hybridization of silver nanoparticles and reduced graphene nanosheets into a nanocomposite for highly sensitive L-phenylalanine biosensing. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 8, p. 6833–6843, 2015.

OMIDINIA, E.; SHADJOU, N.; HASANZADEH, M. Immobilization of phenylalanine-dehydrogenase on nano-sized polytaurine: A new platform for application of nano-polymeric materials on enzymatic biosensing technology. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 368–373, 2014a.

OMIDINIA, E.; SHADJOU, N.; HASANZADEH, M. Electrochemical nanobiosensing of phenylalanine using phenylalanine dehydrogenase incorporated on amino-functionalized mobile crystalline material-41. **IEEE Sensors Journal**, v. 14, n. 4, p. 1081–1088, 2014b.

PAL, P.; NANDI, D.; MISRA, T. N. Immobilization of alcohol dehydrogenase enzyme in a Langmuir-Blodgett film of stearic acid: its application as an ethanol sensor. **Thin Solid Films**, v. 239, n. 1, p. 138–143, 1994.

PAVINATTO, F. J. Bioactive Biomolecules Interacting with Cellular Membranes: Modelling with Langmuir Monolayers. In: **Frontiers in Bioactive Compounds**. [s.l: s.n.]. p. 218–254.

PEREIRA, L. S. A. et al. Evidence of photoinduced lipid hydroperoxidation in Langmuir monolayers containing Eosin Y. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 682–689, 2018.

REYES, L. F. et al. The role of the C-terminal region of pulchellin A-chain in the interaction with membrane model systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 1, p. 82–89, 2012.

RODRIGUES, D.; CAMILO, F. F.; CASELI, L. Cellulase and alcohol dehydrogenase immobilized in Langmuir and Langmuir-Blodgett films and their molecular-level effects upon contact with cellulose and ethanol. **Langmuir**, v. 30, n. 7, p. 1855–1863, 2014.

SABATINI, K.; MATTILA, J. P.; KINNUNEN, P. K. J. Interfacial behavior of cholesterol, ergosterol, and lanosterol in mixtures with DPPC and DMPC. **Biophysical Journal**, 2008.

- SAKAI, A. et al. Controlling the luminescence properties of poly(p-phenylene vinylene) entrapped in Langmuir and Langmuir-Blodgett films of stearic acid. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 15–16, p. 1753–1759, 2011.
- SCHMIDT, T. F. et al. Interaction of horseradish peroxidase with Langmuir monolayers of phospholipids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 321, n. 1–3, p. 206–210, 2008a.
- SCHMIDT, T. F. et al. Enhanced activity of horseradish peroxidase in Langmuir-Blodgett films of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2291–2297, 2008b.
- SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry: Fourth Edition**. [s.l: s.n.].
- SILIGARDI, G. et al. **Ligand- and drug-binding studies of membrane proteins revealed through circular dichroism spectroscopy** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2014.
- SINGHAL, R. et al. Poly-3-Hexyl Thiophene Langmuir-Blodgett Films for Application to Glucose Biosensor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 277–282, 2004.
- SVENSSON, M. et al. High-performance polymer solar cells of an alternating polyfluorene copolymer and a fullerene derivative. **Advanced Materials**, v. 15, n. 12, p. 988–991, 2003.
- TARHAN, L.; AYAR-KAYALI, H. Immobilization of phenylalanine dehydrogenase and its application in flow-injection analysis system for determination of plasma phenylalanine. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 258–267, 2011.
- TYLER MCQUADE, D.; PULLEN, A. E.; SWAGER, T. M. Conjugated polymer-based chemical sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2537–2574, 2000.
- VÁZQUEZ, R. F. et al. Interaction of acylated and unacylated forms of E. coli alpha-hemolysin with lipid monolayers: a PM-IRRAS study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 76–83, 2017.
- VILLALONGA, R. et al. Supramolecular-mediated immobilization of L-phenylalanine dehydrogenase on cyclodextrin-coated Au electrodes for biosensor applications. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 3, p. 447–452, 2007.
- VILLALONGA, R. et al. Covalent immobilization of phenylalanine dehydrogenase on cellulose membrane for biosensor construction. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 129, n. 1, p. 195–199, 2008.
- VOLLHARDT, D. **Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic**

**characterization of monolayers at the air/water interface***Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2014.

VOLPATI, D. et al. **Vibrational spectroscopy for probing molecular-level interactions in organic films mimicking biointerfaces***Advances in Colloid and Interface Science*, 2014.

WALKER, J. Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH). **Biochemical Education**, v. 20, n. 1, p. 42–43, 1992.

WANG, K. H. et al. Headgroup effects of template monolayers on the adsorption behavior and conformation of glucose oxidase adsorbed at air/liquid interfaces. **Langmuir**, v. 27, n. 12, p. 7595–7602, 2011.

WANG, K. H. et al. Immobilization of glucose oxidase by Langmuir-Blodgett technique for fabrication of glucose biosensors: Headgroup effects of template monolayers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 164, n. 1, p. 29–36, 2012.

WEISS, D. J. et al. Dehydrogenase based reagentless biosensor for monitoring phenylketonuria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2436–2441, 2007.

WENDEL, U. et al. A new approach to the newborn screening for hyperphenylalaninemias: use of L-phenylalanine dehydrogenase and microtiter plates. **Clinica Chimica Acta**, v. 192, n. 3, p. 165–170, 1990.

WENDEL, U.; HUMMEL, W.; LANGENBECK, U. Monitoring of phenylketonuria: A colorimetric method for the determination of plasma phenylalanine using l-phenylalanine dehydrogenase. **Analytical Biochemistry**, v. 180, n. 1, p. 91–94, 1989.

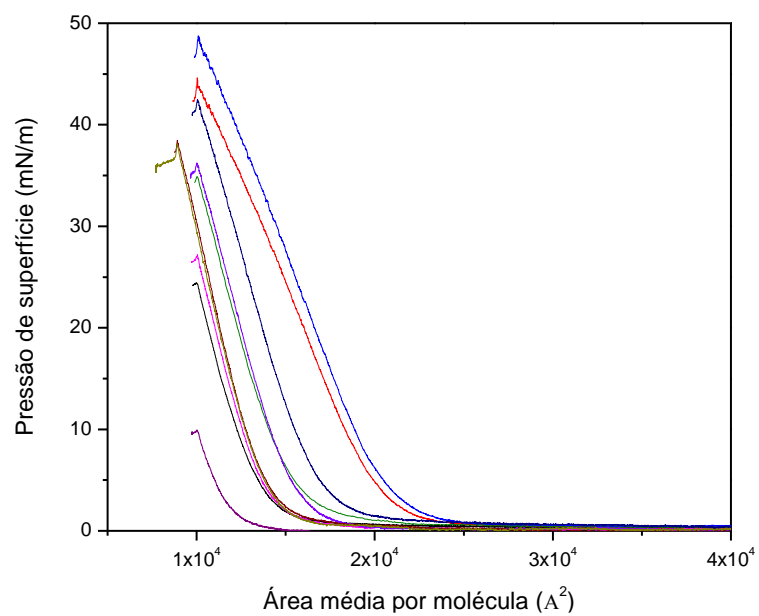
WONG, P. W.; O'FLYNN, M. E.; INOUE, T. Micromethods for Measuring Phenylalanine and Tyrosine in Serum. **Clinical chemistry**, v. 10, p. 1098–1104, 1964.

YUN, H. et al. Physicochemical properties of phosphatidylcholine (PC) monolayers with different alkyl chains, at the air/water interface. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 24, n. 3, p. 377–383, 2003.

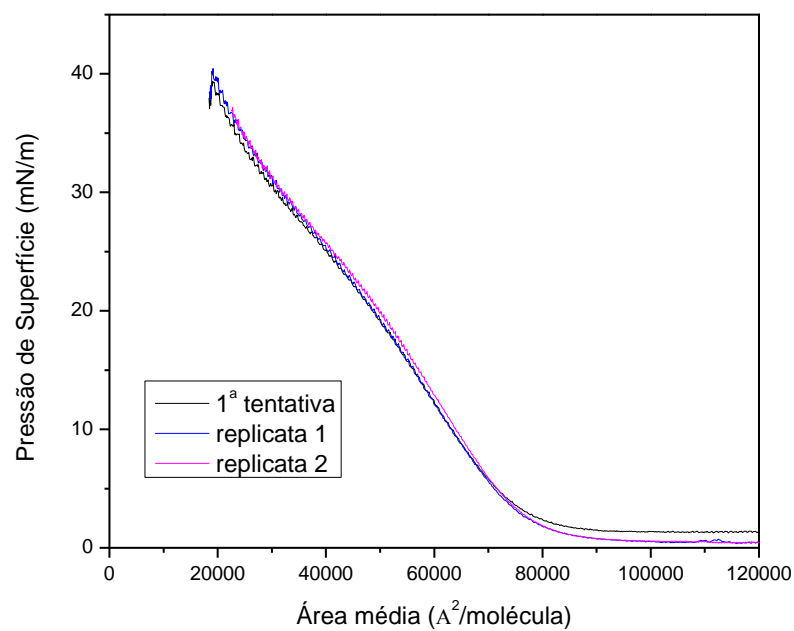
ZANON, N. C. M.; OLIVEIRA, O. N.; CASELI, L. Immobilization of uricase enzyme in Langmuir and Langmuir-Blodgett films of fatty acids: Possible use as a uric acid sensor. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 373, n. 1, p. 69–74, 2012.

ZASADZINSKI, J. A. et al. Langmuir-Blodgett films. **Science**, v. 263, n. 5154, p. 1726–1733, 1994.

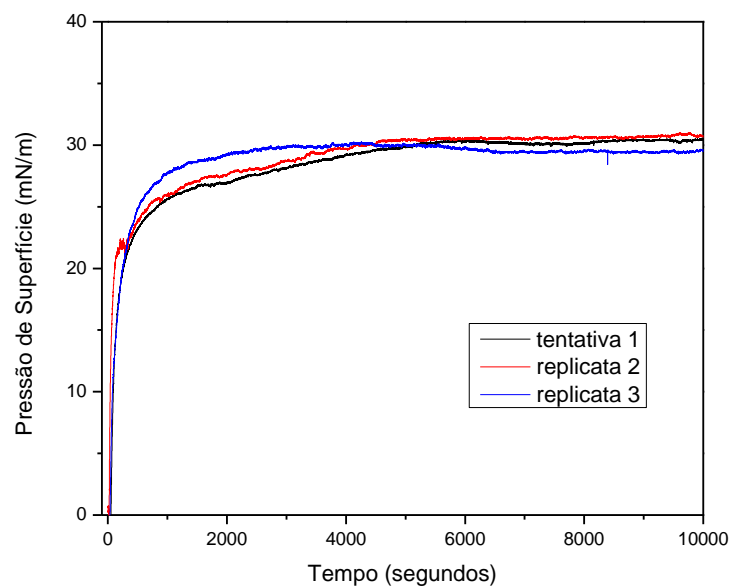
## 7. APÊNDICE



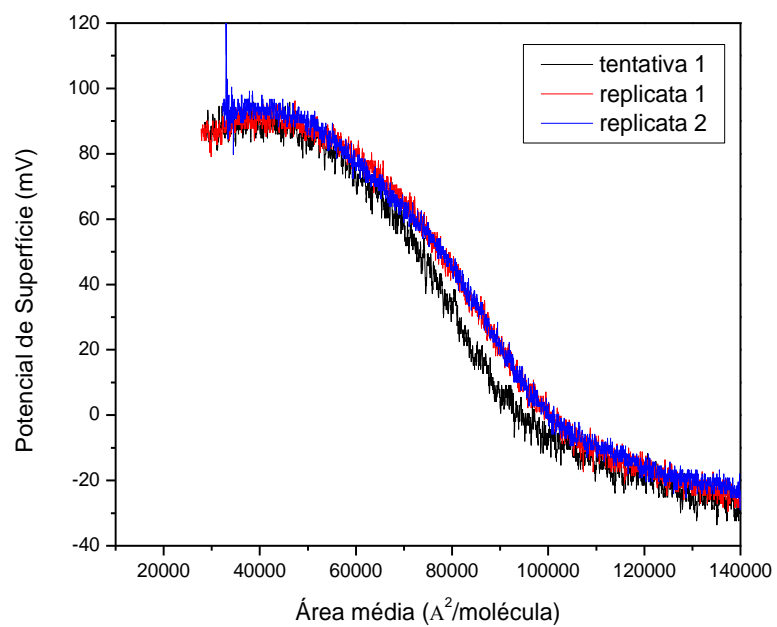
**Figura A1** - Isotermas pressão de superfície-área para a enzima PDH em subfase de água ultrapura.



**Figura A2** – Repetições das isotermas pressão de superfície-área para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio 100 mM.

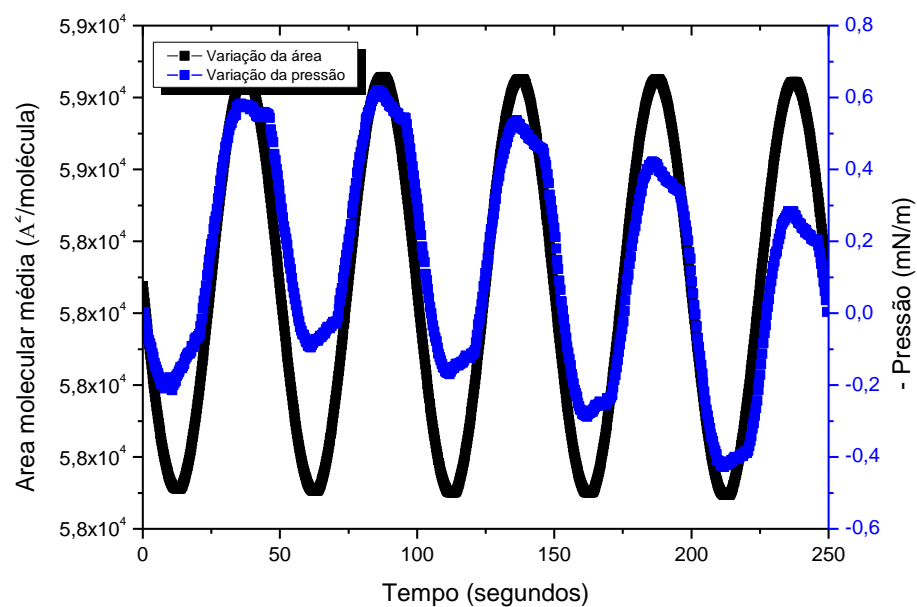


**Figura A3** - Repetições das curvas de cinética de adsorção da enzima PDH em subfase de cloreto de sódio 100 mM.

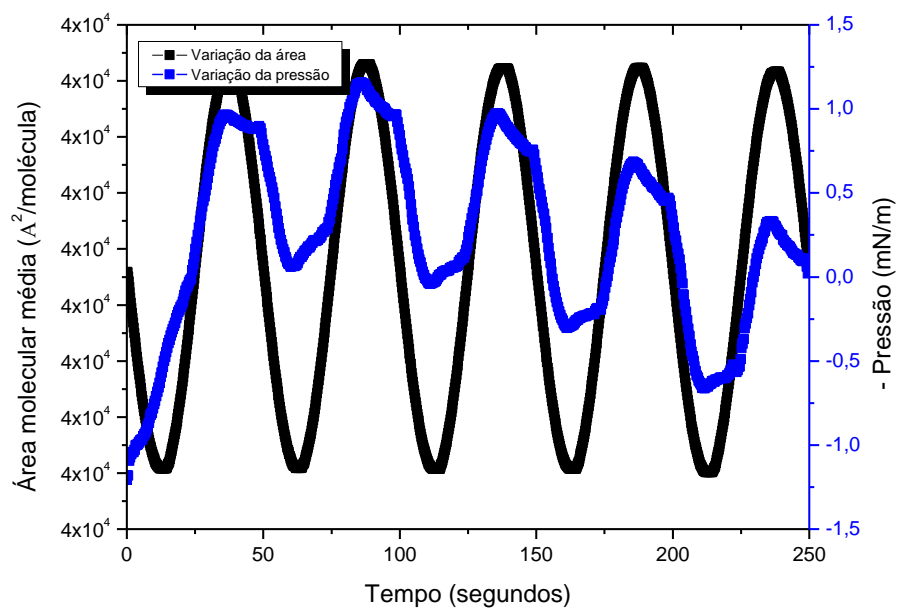


**Figura A4** – Repetições das isotermas potencial de superfície-área para a enzima PDH em subfase de cloreto de sódio 100 mM.

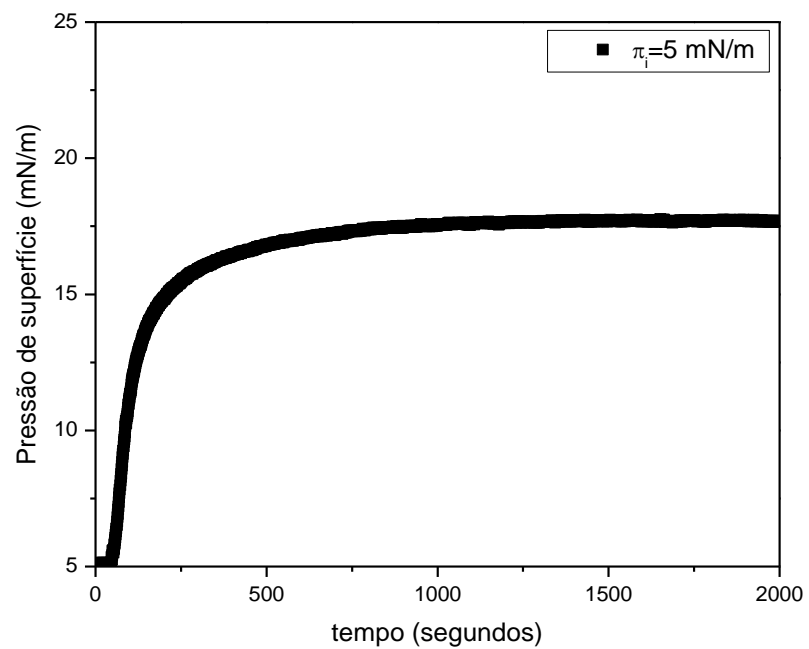




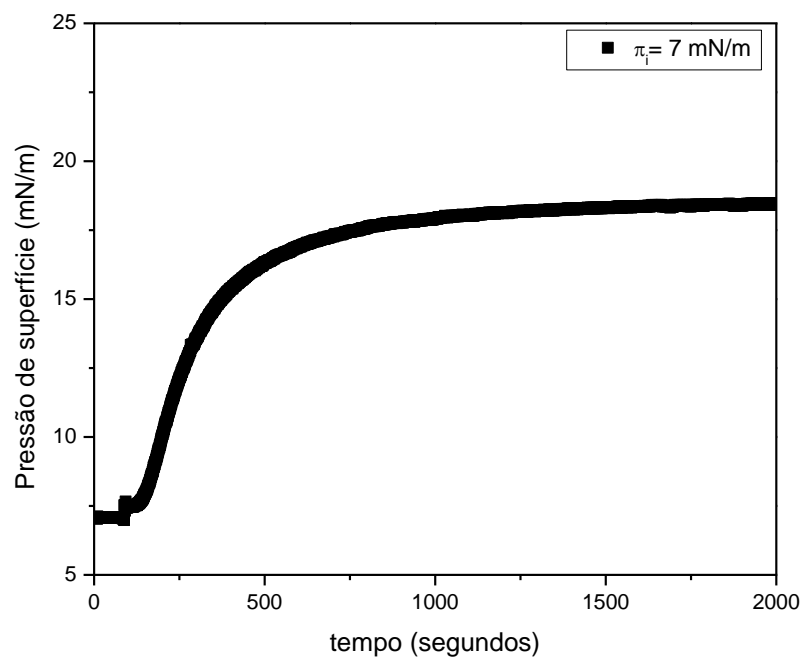
**Figura A5** – Ciclos de oscilação para a monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM para a pressão de superfície de 20 mN/m.



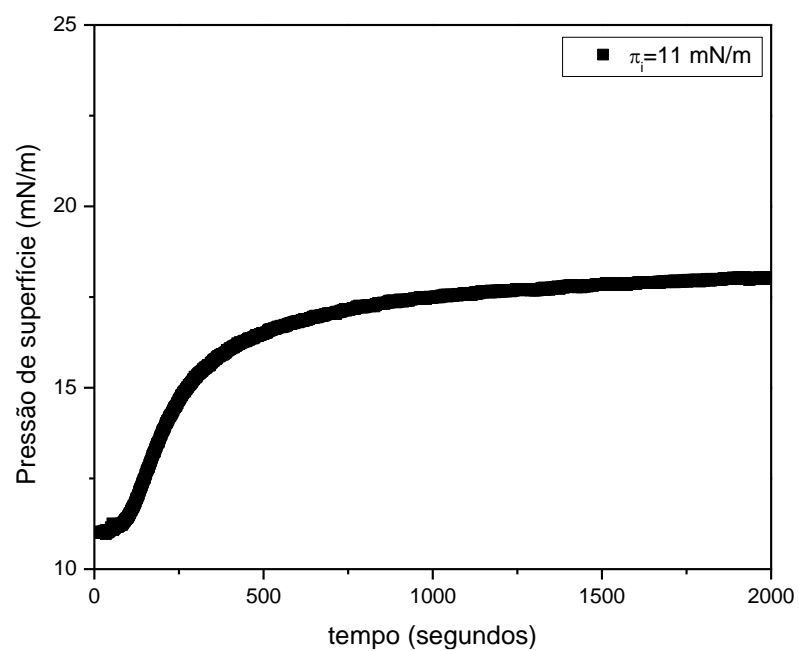
**Figura A6** – Ciclos de oscilação para a monocamada de PDH em subfase de NaCl 100 mM para a pressão de superfície de 30 mN/m.



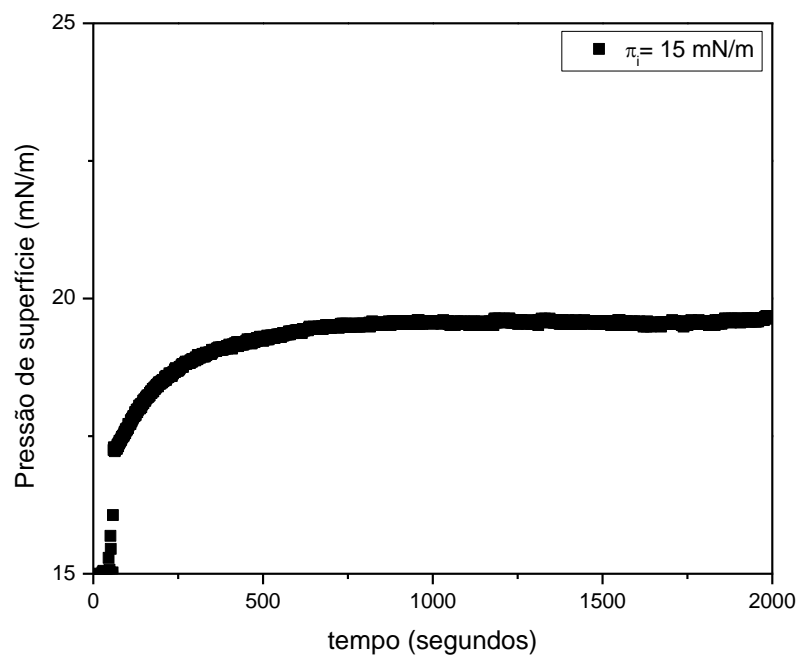
**Figura A7** – Cinética de adsorção da enzima PDH em monocamada de HSt a uma pressão inicial de 5 mN/m e subfase de cloreto de sódio 100 mM.



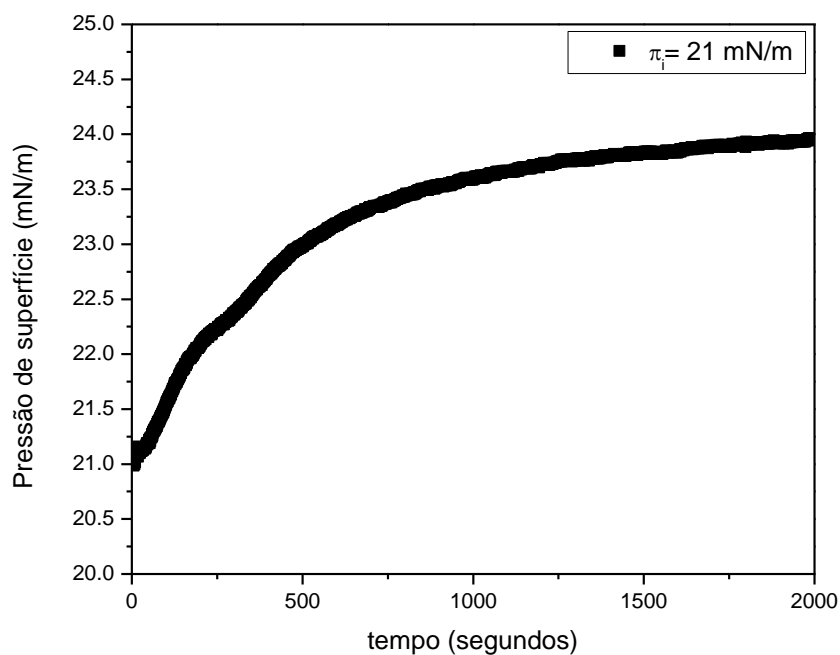
**Figura A8** – Cinética de adsorção da enzima PDH em monocamada de HSt a uma pressão inicial de 7 mN/m e subfase de cloreto de sódio 100 mM.



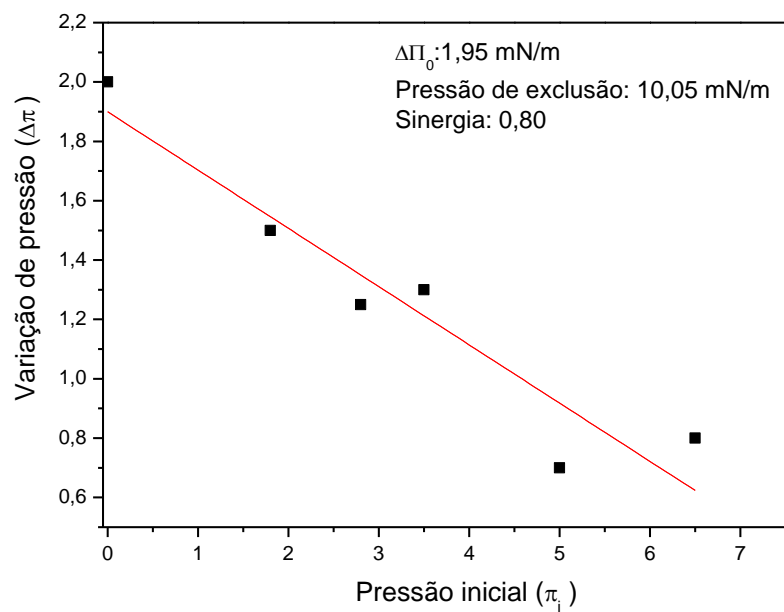
**Figura A9** – Cinética de adsorção da enzima PDH em monocamada de HSt a uma pressão inicial de 11 mN/m e subfase de cloreto de sódio 100 mM.



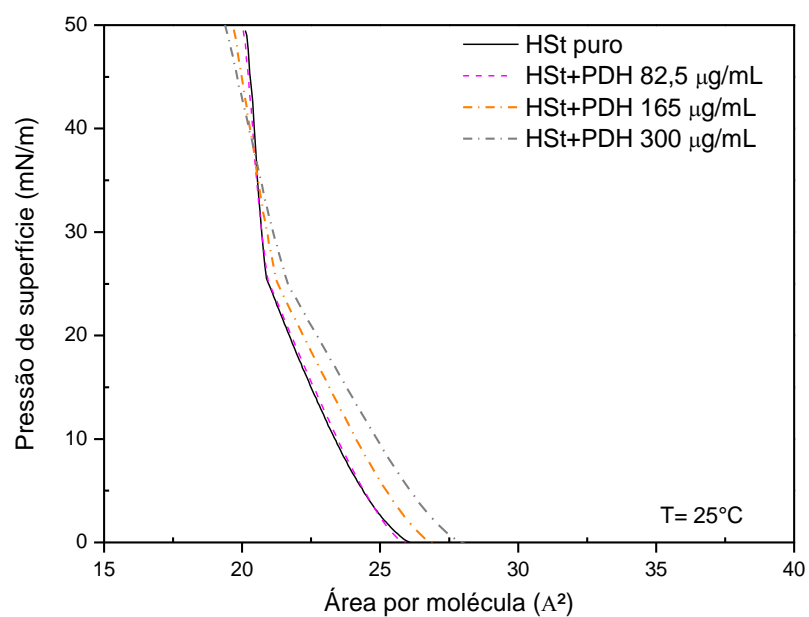
**Figura A10** – Cinética de adsorção da enzima PDH em monocamada de HSt a uma pressão inicial de 15 mN/m e subfase de cloreto de sódio 100 mM.



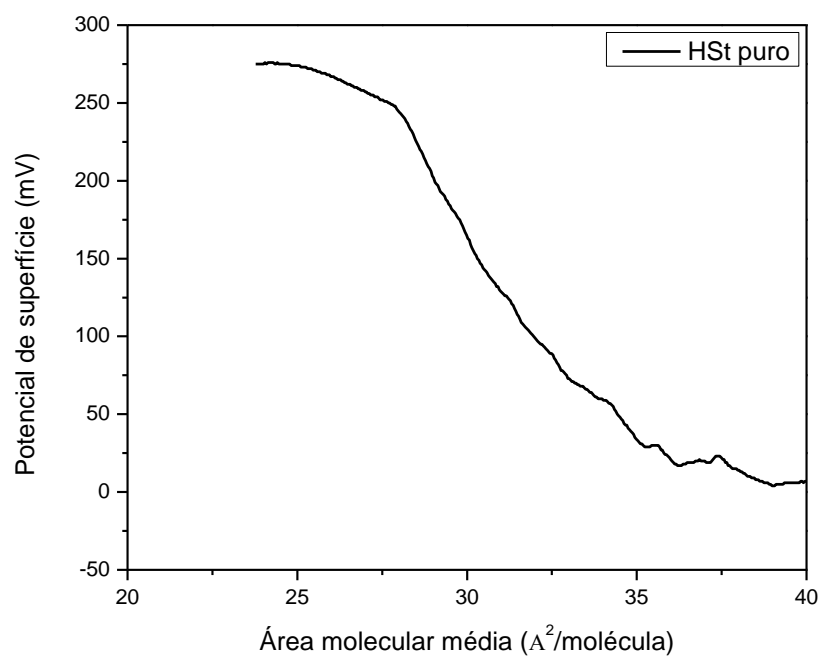
**Figura A11** – Cinética de adsorção da enzima PDH em monocamada de HSt a uma pressão inicial de 21 mN/m e subfase de cloreto de sódio 100 mM.



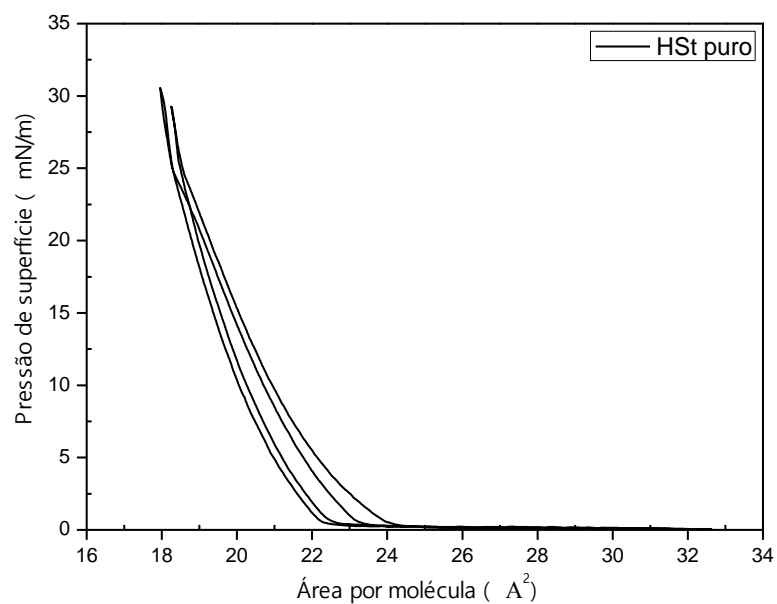
**Figura A12** – Gráfico de variação de pressão de superfície em função da pressão de superfície inicial para a inserção da enzima PDH em monocamadas de HSt em subfase de água ultrapura.



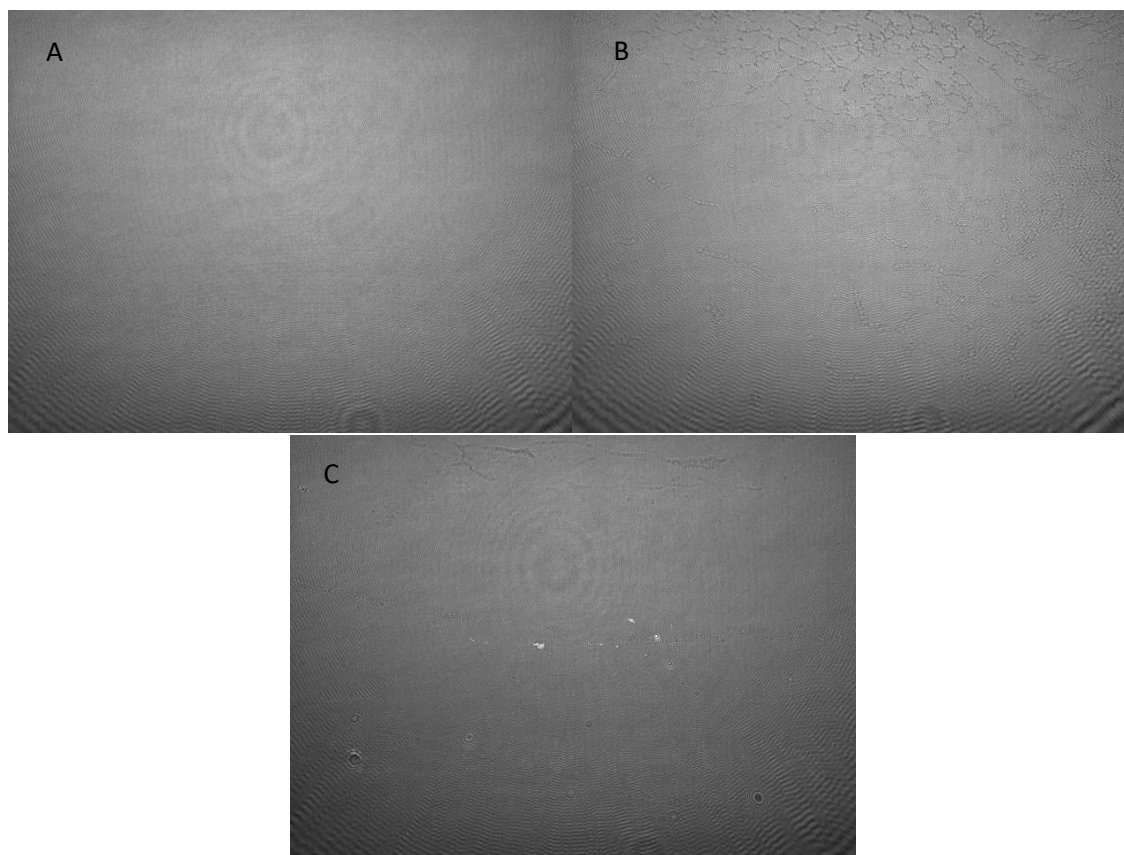
**Figura A13** – Isotermas pressão de superfície-área para o sistema HSt+PDH em diferentes concentrações de enzima em subfase de água ultrapura.



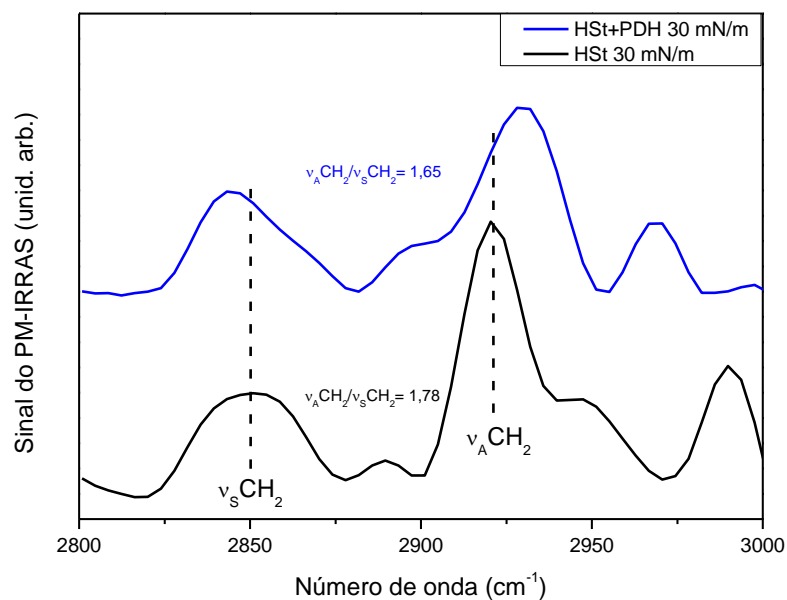
**Figura A14** – Potencial de superfície obtido ao longo da compressão isotérmica do filme de HSt em subfase de água ultrapura.



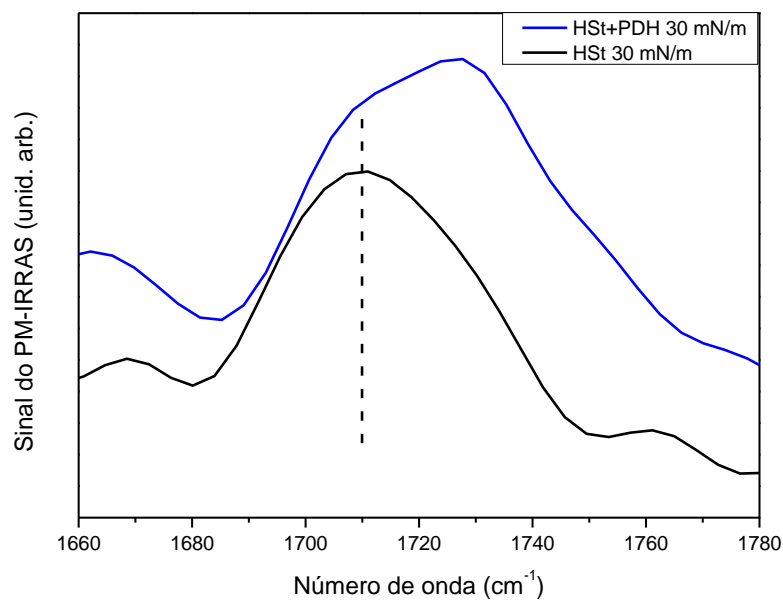
**Figura A15** – Ciclos de compressão e descompressão obtidos para o filme de HSt em subfase de água ultrapura.



**Figura A16** – Microscopia no ângulo de Brewster para a monocamada de HSt na fase gás (A), no início da transição de fases (B) e em sua fase mais condensada (C). Resolução de 3600 x 4000  $\mu\text{m}$ .



**Figura A17** – Espectros de PM-IRRAS na região de 2800 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  para a monocamada de HSt+PDH em subfase de água ultrapura na pressão de superfície de 30 mN/m.

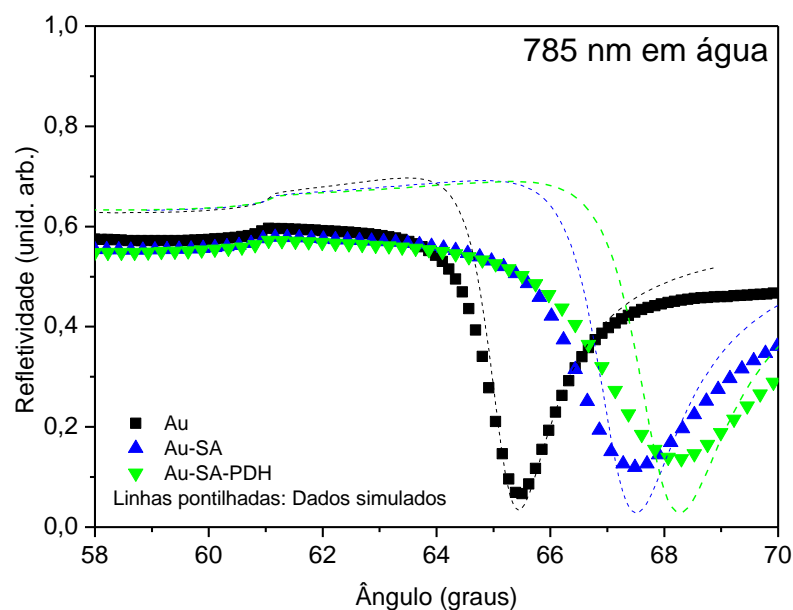


**Figura A18** – Espectros de PM-IRRAS na região de 1660 a 1780  $\text{cm}^{-1}$  para a monocamada de HSt+PDH em subfase de água ultrapura na pressão de superfície de 30 mN/m.

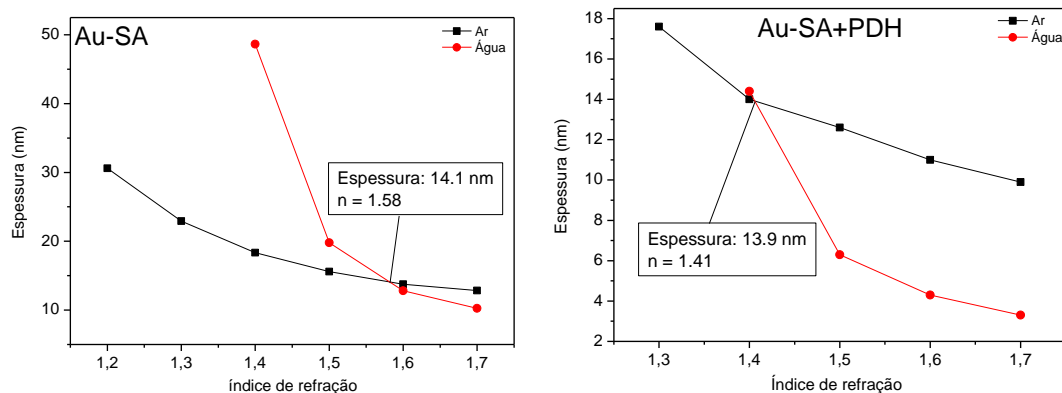
**Tabela A1 -**

Número de camadas	Taxa de transferência média	Substrato
1	1,2	Quartzo (Fluorescência)/Cinética
5	0,85	
9	0,82	
15	0,87	
1	1,4	Mica (AFM)
5	0,91	

1	1,2	Quartzo (CD)
5	0,84	

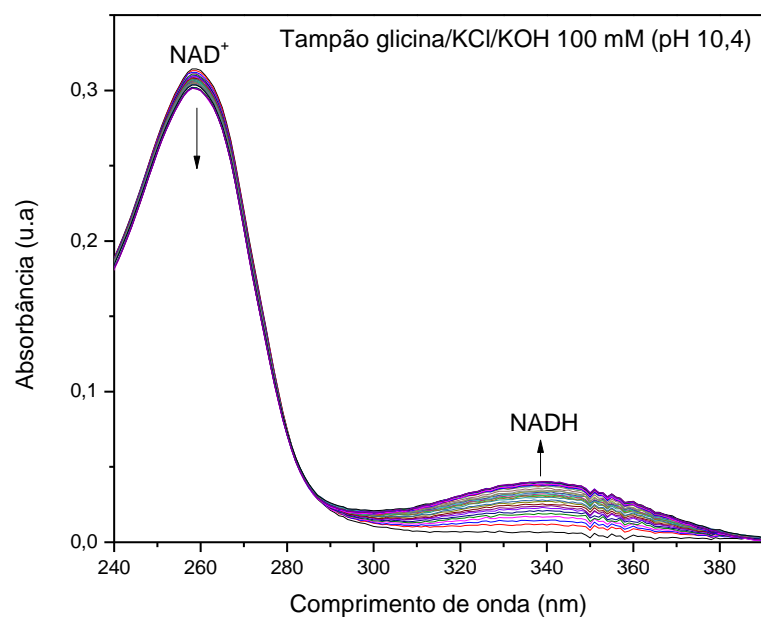


**Figura A19** – Espectro de SPR para filmes com 5 camadas depositadas como filmes LB de HSt puro (em azul) e na presença da enzima PDH (em verde) em substratos de ouro funcionalizados com cisteína utilizando laser com comprimento de onda em 785 nm.



**Figura A20** – Espessura calculada para os filmes depositados sobre os substratos de ouro em ar (em preto) e água ultrapura (em vermelho) como função do comprimento de onda observado via SPR.





**Figura A21** – Variação da absorvância do cofator NAD<sup>+</sup> em sua forma oxidada (260 nm) ao longo da reação da enzima PDH na presença de L-fenilalanina dando origem à banda de absorção da forma reduzida do cofator em 340 nm.